

Diagnostische Fusions- und Linkerproteine zur Entwicklung neuartiger Immunoassays

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nina Kirsten Dassinger

aus Siegen

Marburg/Lahn 2015

Vom Fachbereich_____

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am_____

_____angenommen.

Erstgutachter_____

Zweitgutachter_____

Tag der mündlichen Prüfung am_____

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen für die Möglichkeit, unter seiner Leitung diese Dissertation anfertigen zu dürfen und für seine Funktion als Erstgutachter. Ich bedanke mich für die stets fruchtbare Zusammenarbeit und die herzliche Aufnahme sowie das Vertrauen welches mir entgegen gebracht wurde. Des Weiteren gilt mein herzlichster Dank Herrn Dr. Doru Vornicescu. Die interdisziplinäre Zusammenarbeit mit ihm hat diese Arbeit sehr geprägt und es ermöglichte uns beiden, stets mehrere Facetten eines Problems betrachten zu können. Zudem danke ich ihm für seinen unermüdlichen Einsatz im Bereich der Biosensorik.

Ein großer Dank geht auch an die Prüfungskommission. Herr Prof. Dr. Klaus Reuter war so freundlich das Zweitgutachten anzufertigen. Zudem danke ich ihm für sein stets offenes Ohr, wenn immer es nötig war. Frau Prof. Dr. Petersen und Herr Prof. Dr. Bünemann danke ich ebenfalls für ihre Mühe, als Nebenfachprüfer zu fungieren.

Ich möchte mich auch bei der Arbeitsgruppe Klebe bedanken. Sie haben mich stets in ihrem Labor willkommen geheißen, auch wenn es mal etwas eng wurde. Zudem möchte ich der Arbeitsgruppe Hartmann für die Benutzung ihrer Laboratorien danken.

Ein herzlicher Dank geht auch die gesamte Arbeitsgruppe Keusgen. Insbesondere möchte ich mich bei Floris van Elsäcker, Gabriela Mielke und Steffen Neumann für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere natürlich bei meinen Eltern, bedanken. Ich danke ihnen für ihre immerwährende, tatkräftige Unterstützung und Rückhalt auch in schwierigen Zeiten.

„Erfahrung ist das, was man erlangt,
kurz nachdem man es hätte gebrauchen können.“

Isabel Allende

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XIII
Abkürzungsverzeichnis	XV
1 Einleitung	1
1.1 Problemstellung und Idee des Forschungsvorhabens.....	2
1.2 Anreicherungsmodul und Regenerierbarkeit von Oberflächen	4
1.2.1 Concanavalin A	7
1.2.2 Mannan	10
1.2.3 Dextran	10
1.2.4 Streptavidin	11
1.3 Fusionsproteine zur Sensitivitätssteigerung von Immunoassays	12
1.3.1 Lyme-Borreliose (Erythema chronicum migrans).....	12
1.3.1.1 Immunologische Detektion von Borreliose im Blutserum.....	14
1.3.1.1.1 Oberflächen Protein C (Outer Surface Protein C).....	15
1.3.1.1.2 Variable major protein like sequence E (VlsE).....	15
1.3.2 Pankreatitis und Pankreasinsuffizienz im Veterinärbereich	16
1.3.2.1 Immunologische Detektion von <i>feline</i> trypsinogen-like immunoreactivity (fTLI) im Blutserum.....	18
1.3.2.1.1 Protein A	19
1.3.2.1.2 Antikörper: IgG-Globuline	20
2 Zielsetzung.....	23
3 Material	25
3.1 Lösungsmittel und Chemikalien.....	25
3.2 Instrumente	27
3.3 Verbrauchsmaterialien	29
3.4 Enzyme, Kits, Seren, Antikörper und Proteine	29
3.5 Antibiotika	34
4 Methoden.....	35
4.1 Molekularbiologische Methoden.....	35
4.1.1 PCR, Klonierung.....	35
4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	35
4.1.3 Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA Fragmenten	37
4.1.3.1 Isolierung und Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose- Gelen	38
4.1.4 Mutagenese	38
4.2 Mikrobiologische Methoden.....	40
4.2.1 Organismen	40
4.2.1.1 Bakterienstämme.....	40

4.2.2	Herstellung kompetenter Zellen	40
4.2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	41
4.2.4	Herstellung von Glycerol Gefrierkulturen zur Stammhaltung	42
4.3	Proteinbiochemische Methoden	42
4.3.1	Proteinexpression	42
4.3.2	Inclusion body-Aufreinigung.....	43
4.3.3	Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure	44
4.3.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Amidoschwarz-Methode	45
4.3.5	Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
4.3.6	Western Transfer auf PVDF-Membran.....	47
4.3.7	ECL-Detektion des Western Transfers	49
4.3.8	Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	50
4.4	Analytische Methoden	50
4.4.1	Co-Immunopräzipitation	50
4.4.2	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (Enzyme-linked Immunosobent Assay).....	52
4.4.2.1	Nachweis der Bindeaktivität der Linkerproteine ConA-OspC und ConA-C6 mittels ELISA.....	53
4.4.3	Immunologische Detektion auf 3D-Polymersinterkörpern.....	54
4.4.3.1	Immobilisierung des Linkerproteins ConA-ProtA auf 3D-Polymersinterkörpern mittels hydrophober Wechselwirkung mit anschließendem Messablauf.....	55
4.4.3.2	Immobilisierung des Linkerproteins ConA-ProtA auf mit Mannan funk+ -tionalisierten 3D-Polymersinterkörpern und nachfolgendem Messablauf.....	57
4.4.4	Biosensoren.....	58
4.4.4.1	Oberflächen Plasmon Resonanz	59
4.4.4.1.1	Herstellung von Zucker Oberflächen für SPR	62
4.4.4.1.2	Herstellung von C-18 Oberflächen für SPR.....	63
4.4.4.1.3	Analyseablauf mittels SPR	64
4.4.4.2	Reflektometrische Interferenz Spektroskopie	64
4.4.4.2.1	Herstellung von Zucker Oberflächen für die RIfS	65
4.4.4.2.2	Herstellung von C-18 Oberflächen für die RIfS	67
4.4.4.2.3	Analyseablauf mittels RIfS.....	68
4.4.4.3	Mannanfunktionalisierung von C-18-Oberflächen.....	69
4.4.5	Rasterkraftmikroskopie	69

5 Ergebnisse 71

5.1	Vorversuch.....	71
5.1.1	Kontrolle des Expressionsvektors pET-15b zur weiteren Klonierung.....	71
5.2	ConA-SAv	73
5.2.1	Klonierungsstrategie, Gensequenzen, Restriktionsanalysen ConA-SAv.....	73
5.2.2	Expressionskinetik und Proteinaufreinigung von ConA-SAv	74
5.2.3	Assay Modell ConA-SAv	77
5.2.4	Co-Immunopräzipitation	79

5.2.5	Reflektometrische Interferenz Spektroskopie auf Dextranoberfläche	81
5.2.6	Surface Plasmon Resonance auf Mannanoberfläche.....	84
5.2.7	Weiterführende Versuche zur Regenerationsfähigkeit	86
5.2.8	Mutagenese von ConA-SAv	88
5.2.8.1	Mutante D90N.....	91
5.2.8.2	Mutante R110K.....	92
5.3	Anpassung der Blockierungsreagenzien an die Serum-Matrix	93
5.4	Immunologische Detektion von Borreliose im Blutserum mittels ConA-OspC	95
5.4.1	Klonierungsstrategie, Gensequenzen, Restriktionsanalysen ConA-OspC.....	95
5.4.2	Expressionskinetik und Proteinaufreinigung von ConA-OspC	97
5.4.3	Assay Modell ConA-OspC	98
5.4.4	Oberflächen Plasmon Resonanz von ConA-OspC auf C-18 Oberfläche.....	99
5.4.5	Oberflächen Plasmon Resonanz von ConA-OspC auf Mannanoberfläche ..	101
5.4.6	Reflektometrische Interferenz Spektroskopie-Messungen auf Mannan- oberfläche.....	102
5.5	Immunologische Detektion von Borreliose im Blutserum mittels ConA-C6.....	104
5.5.1	Klonierungsstrategie, Gensequenzen, Restriktionsanalysen ConA-C6	104
5.5.2	Expressionskinetik und Proteinaufreinigung von ConA-C6.....	106
5.5.3	Assay Modell ConA-C6	108
5.5.4	Oberflächen Plasmon Resonanz von ConA-C6 auf C-18 Oberfläche	109
5.5.5	Oberflächen Plasmon Resonanz von ConA-C6 auf Mannanoberfläche	110
5.5.6	RfS Messungen auf Mannanoberfläche	112
5.6	ELISA Messungen mit ConA-OspC und ConA-C6 in direktem Vergleich zur Ermittlung der Signifikanz.....	113
5.7	Langzeitstudien zur Haltbarkeit der Fusionsproteine ConA-OspC und ConA- C6	115
5.7.1	Langzeitstudie für ConA-OspC	116
5.7.1.1	Hydrophobe Immobilisierung	116
5.7.1.2	Mannanoberfläche	120
5.7.2	Langzeitstudie für ConA-C6.....	122
5.7.2.1	Hydrophobe Immobilisierung	122
5.7.2.2	Mannanoberfläche	125
5.8	Detektion von fTLI im Blutserum mittels ConA-ProtA	128
5.8.1	Klonierungsstrategie, Gensequenzen, Restriktionsanalysen ConA-ProtA ...	128
5.8.2	Expressionskinetik und Proteinaufreinigung von ConA-ProtA	130
5.8.3	Assay Modell ConA-ProtA.....	131
5.8.4	Detektion von fTLI auf C-18 Oberfläche mittels Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie	132
5.8.5	Detektion von fTLI auf Mannanoberfläche mittels Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie	134
5.8.6	Detektion von fTLI auf Mannanoberfläche mittels Oberflächen Plasmon Resonanz	135
5.8.7	Detektion von fTLI in Real-Proben mittels Oberflächen Plasmon Resonanz	138
5.8.8	Immunologische Detektion von fTLI auf 3D-Polysinterkörpern	139

5.9	Untersuchung der Glasoberflächenfunktionalisierung mittels Rasterkraftmikroskopie	143
6	Diskussion.....	147
6.1	Auswahl des Blockierungsreagenzes	147
6.2	ConA-SAv	148
6.2.1	Co-Immunopräzipitation	149
6.2.2	Bindungsstudien mittels Biosensor	149
6.2.3	Mutanten des ConA-SAv Linkerproteins	152
6.2.3.1	D90N	152
6.2.3.2	R110K	Fehler! Textmarke nicht definiert.
6.3	Detektion von Lyme-Borreliose im Blutserum	154
6.3.1	Borreliose Assay mit ConA-OspC	154
6.3.1.1	Biosensormessungen	154
6.3.2	Borreliose Assay mit ConA-C6	156
6.3.2.1	Biosensormessungen	157
6.3.3	Diskussion der biosensorischen Messungen für ConA-OspC und ConA-C6 im Zusammenhang	158
6.3.4	ELISA Messungen mit ConA-OspC und ConA-C6 in direktem Vergleich zur Ermittlung der Signifikanz	159
6.3.5	Langzeitstudien der Fusionsproteine ConA-OspC und ConA-C6	159
6.4	fTLI-Assay mit ConA-ProtA.....	161
6.4.1	Bindungsstudien	161
6.4.2	Immunologische Detektion von fTLI auf 3D-Polymersinterkörpern	162
6.5	Rasterkraftmikroskopie	163
7	Zusammenfassung	165
8	Fazit	167
9	Literaturverzeichnis	169
10	Anhang	181
10.1	DNA-Sequenz von ConA-SAv.....	181
10.2	DNA-Sequenz von ConA-OspC	182
10.3	DNA-Sequenz von ConA-C6	183
10.4	DNA-Sequenz von ConA-ProtA	184
10.5	Messwerte der ELISA Untersuchungen zu ConA-OspC und ConA-C6 mit Signifikanzermittlung	185
10.6	Messwerte fTLI Nachweis auf 3D-Polymersinterkörpern.....	186
11	Publikationen	187

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf einer Analyse	6
Abbildung 2: D-Mannose	10
Abbildung 3: Dextran Molekül	10
Abbildung 4: Biotin-Molekül	11
Abbildung 5: Übertragungszyklus des Erregers der Lyme-Borreliose.....	13
Abbildung 6: Stilisierte Karte des VlsE Gens.	16
Abbildung 7: Makroskopische Bild von Pankreasgewebe	17
Abbildung 8 Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpermoleküls	21
Abbildung 9: Größenmarker für DNA-Gelelektrophorese.....	37
Abbildung 10: Mikrosäule des ABICAP®-Systems.....	55
Abbildung 11: Prinzip eines Biosensors.....	59
Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines SPR-Biosensors	60
Abbildung 13: Kurvenverlauf Biosensor	61
Abbildung 14: Prinzip der Reflektometrischen Interferenz Spektroskopie.....	65
Abbildung 15: Schema eines Rasterkraftmikroskops	70
Abbildung 16: Restriktionsanalyse des Vektors pET-15b.....	72
Abbildung 17: Abbildung der <i>multiple cloning site</i> des pET-15b Vektors.	72
Abbildung 18: Plasmidkarte des ConA-SAv Konstrukts (links) und DNA Restriktion des Plasmidkonstrukts (rechts).....	74
Abbildung 19: Expressionskinetik von ConA-SAv.	75
Abbildung 20: Mikroskopische Darstellung von Inclusion bodies in <i>E. coli</i>	75
Abbildung 21: Untersuchung zum Löslichkeitsverhalten von ConA-SAv	76
Abbildung 22: SDS-PAGE und Western Blot nach Inclusion body-Aufreinigung des ConA- SAv.	77
Abbildung 23: Konzept Assay ConA-SAv auf Zucker Oberfläche.	78
Abbildung 24: Co-Immunopräzipitation des ConA-SAv-Proteins.....	80
Abbildung 25: RIfS-Sensorgramm. Regeneration von ConA-SAv auf einer mit Dextran funktionalisierten Glasoberfläche.....	82
Abbildung 26: RIfS-Sensorgramm von ConA-SAv auf einer mit Dextran funktionalisierten Glasoberfläche..	83
Abbildung 27: SPR-Sensorgramm von ConA-SAv auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche.	85
Abbildung 28: SPR-Sensorgramm Kontrollexperiment von ConA-SAv auf einer C-18- funktionalisierten Goldoberfläche.	86
Abbildung 29: RIfS-Sensorgramme Zusammenfassung Regenerationsexperimente	87
Abbildung 30: Überblick QuickChange® Site-Directed Mutagenese Methode.....	88

Abbildung 31: L-Asparaginsäure und L-Asparagin	90
Abbildung 32: L-Arginin und L-Lysin	90
Abbildung 33: SPR-Sensorgramm von D90N und ConA-Sav auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche.	92
Abbildung 34: SPR-Sensorgramm von R110K auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche.	93
Abbildung 35: SPR-Sensorgramm. Kontrollexperiment: Mannanoberfläche mit Blockierungsreagenz mit anschließender Applikation von anti-OspC positivem Serum (Hd3 Vollbildserum).	94
Abbildung 36: RfS-Sensorgramm. Kontrollexperiment: C-18-Oberfläche mit ConA-ProtA und anschließender Applikation von BSA.....	95
Abbildung 37: Plasmidkarte des ConA-OspC Konstrukts (links) und DNA Restriktion des Plasmidkonstrukts (rechts).....	96
Abbildung 38: SDS-PAGE der Expressionskinetik für ConA-OspC in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)...	97
Abbildung 39: ConA-OspC Fusionsprotein nach Inclusion body Aufreinigung	98
Abbildung 40: Konzept Assay ConA-OspC auf Zucker Oberfläche.....	99
Abbildung 41: SPR-Sensorgramm von ConA-OspC auf einer C-18-funktionalisierten Goldoberfläche.	100
Abbildung 42: SPR-Sensorgramm von ConA-OspC auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche	102
Abbildung 43: RfS-Sensorgramme ConA-OspC auf Mannanoberfläche.	103
Abbildung 44: RfS-Sensorgramm; Kontrollexperiment. Blockierung (unspezifische Bindungsstellen) der Mannanoberfläche mit anschließender Applikation des positiven Serums (Hd3).	104
Abbildung 45: Strukturkarte des VlsE Proteins nach Liang et al., 2000	105
Abbildung 46: Plasmidkarte des ConA-C6 Konstrukts (links) und DNA Restriktion des Plasmidkonstrukts (rechts).....	106
Abbildung 47: SDS-PAGE der Expressionskinetik für ConA-C6 in <i>E. coli</i>	107
Abbildung 48: ConA-C6 Fusionsprotein nach Inclusion body-Aufreinigung.	107
Abbildung 49: Konzept Assay ConA-C6- auf Zucker Oberfläche	108
Abbildung 50: SPR-Sensorgramm von ConA-C6 auf einer C-18-funktionalisierten Goldoberfläche.	110
Abbildung 51: SPR-Sensorgramm von ConA-C6 auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche.	111
Abbildung 52: RfS-Sensorgramm von ConA-C6 auf Mannanoberfläche.	112
Abbildung 53: ELISA Messung von ConA-C6 und ConA-OspC auf Mannanoberfläche. ...	114
Abbildung 54: ELISA Messung von ConA-OspC mittels hydrophober Immobilisierung ohne Zusätze bei Lyophilisierung.....	117
Abbildung 55: ELISA Messung von ConA-OspC mittels hydrophober Immobilisierung mit Zusatz von 10% Saccharose bei Lyophilisierung.....	118

Abbildung 56: ELISA Messung von ConA-OspC mittels hydrophober Immobilisierung mit Zusatz von LPS bei Lyophilisierung.	119
Abbildung 57: ELISA Messung von ConA-OspC auf Mannanoberfläche ohne Zusätze bei Lyophilisierung.	120
Abbildung 58: ELISA Messung von ConA-OspC auf Mannanoberfläche mit Zusatz von 10% Saccharose bei Lyophilisierung.	121
Abbildung 59: ELISA Messung von ConA-OspC auf Mannanoberfläche mit Zusatz von LPS bei Lyophilisierung.	122
Abbildung 60: ELISA Messung von ConA-C6 mittels hydrophober Immobilisierung ohne Zusätze bei Lyophilisierung.	123
Abbildung 61: ELISA Messung von ConA-C6 mittels hydrophober Immobilisierung mit Zusatz von 10% Saccharose bei Lyophilisierung.	124
Abbildung 62: ELISA Messung von ConA-C6 mittels hydrophober Immobilisierung mit Zusatz von LPS bei Lyophilisierung.	125
Abbildung 63: ELISA Messung von ConA-C6 auf Mannanoberfläche ohne Zusätze bei Lyophilisierung.	126
Abbildung 64: ELISA Messung von ConA-C6 auf Mannanoberfläche mit Zusatz von 10% Saccharose bei Lyophilisierung.	127
Abbildung 65: ELISA Messung von ConA-C6 auf Mannanoberfläche mit Zusatz von LPS bei Lyophilisierung.	128
Abbildung 66: Zusammenstellung der 5 Protein A Fc-Bindedomänen sowie einer Protein A Konsensus-Sequenz.	129
Abbildung 67: Plasmidkarte des ConA-ProtA Konstrukts (links) und DNA Restriktion des Plasmidkonstrukts (rechts).	129
Abbildung 68: SDS-PAGE der Expressionskinetik für ProteinA-ConA in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	130
Abbildung 69: SDS-PAGE der aufgereinigten Proteinfraction des ProteinA-ConA.	131
Abbildung 70: Konzept Assay ConA-ProtA- auf Zucker Oberfläche.	132
Abbildung 71: RIfS-Sensorgramm. Modell-Assay auf C-18-Oberfläche.	133
Abbildung 72: RIfS-Sensorgramm. ConA-ProtA Modell-Assay auf Mannanoberfläche.	134
Abbildung 73: SPR-Sensorgramm. ConA-ProtA Modell-Assay auf Mannanoberfläche.	135
Abbildung 74: SPR-Sensorgramme für fTLI Assay.	136
Abbildung 75: Diagramm einer Kalibrationsgeraden mit bekannten fTLI Realproben	139
Abbildung 76: ABICAP® Messungen (<i>Proof-of-Principle</i>) mit gereinigtem fTLI-Antigen.	140
Abbildung 77: Diagramm einer Kalibrationsgeraden mit bekannten fTLI Realproben auf Mannanoberfläche.	141
Abbildung 78: Diagramm einer Messreihe mit unbekannten fTLI Realproben auf Mannanoberfläche.	142
Abbildung 79: AFM Aufnahmen der unfunktionalisierten sowie mit Dextran funktionalisierten Glasoberfläche	144

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Richtwerte fTLI im Blutserum	18
Tabelle 2: Lösungsmittel	25
Tabelle 3: Chemikalien	25
Tabelle 4: Instrumente	28
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 6: DNA-Enzyme und Plasmide.....	30
Tabelle 7: Kits	30
Tabelle 8: Seren für Borreliose Assay	31
Tabelle 9: Seren für fTLI Assay.....	31
Tabelle 10: Antikörper	32
Tabelle 11: Proteine	33
Tabelle 12: Agarosegel-Elektrophorese.....	36
Tabelle 13: Puffer für Elution von DNA-Fragmenten	38
Tabelle 14: Medien und Reagenzien zur Mutagenese	39
Tabelle 15: Primer für Mutagenese.....	39
Tabelle 16: Medien und Reagenzien zur Herstellung kompetenter Zellen	40
Tabelle 17: Medien und Reagenzien zur Transformation von <i>E. coli</i>	41
Tabelle 18: Medien und Reagenzien zur Herstellung von Glycerol-Gefrierkulturen.....	42
Tabelle 19: Medien und Reagenzien zur Proteinexpression	43
Tabelle 20: Medien und Reagenzien zur Inclusion body-Aufreinigung.....	44
Tabelle 21: Medien und Reagenzien zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen	45
Tabelle 22: Medien und Reagenzien zur SDS-PAGE nach Lämmli	46
Tabelle 23: Pipettierschema für SDS-PAGE.....	47
Tabelle 24: Puffer und Reagenzien für Western Transfer auf PVDF-Membran	47
Tabelle 25: Puffer und Reagenzien zum Immunologischen Nachweis von Proteinen	48
Tabelle 26: Puffer und Reagenzien für ECL-Detektion	49
Tabelle 27: Puffer und Reagenzien zur Coomassiefärbung von SDS-PAGE Gelen	50
Tabelle 28: Puffer und Reagenzien für Co-Immunopräzipitation.....	51
Tabelle 29: Puffer und Reagenzien für ELISA Messungen	54
Tabelle 30: Übersicht über die voreingestellten Mixtypes SPR.....	61
Tabelle 31: Messdaten des SPR-Sensorgramms von ConA-OspC auf einer C-18- funktionalisierten Goldoberfläche	100
Tabelle 32: Messdaten der SPR-Sensorgramme von ConA-OspC auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche	101

Tabelle 33: Messdaten der SPR-Sensorgramme von ConA-C6 auf einer C-18-funktionalisierten Goldoberfläche	109
Tabelle 34: Messdaten der SPR-Sensorgramme von ConA-C6 auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche	111
Tabelle 35: Messdaten der SPR-Sensorgramme für fTLI Assay n=1	137
Tabelle 36: Normierung der Signale für fTLI Assay. n=1	138
Tabelle 37: Messdaten der Kalibriergeraden auf 3D-Polymersinterkörpern mit fTLI Realproben n=3.....	141
Tabelle 38: Messdaten der 3D-Polysinterkörper mit fTLI Realproben n=3	142
Tabelle 39: Ergebnisse der AFM Messungen auf Dextranoberfläche	144
Tabelle 40: Messwerte aus Abbildung 53 Kapitel 5.6 n=6 für ConA-OspC	185
Tabelle 41: Messwerte aus Abbildung 55 Kapitel 5.6 n=6 für ConA-C6	186
Tabelle 42: Messwerte aus Abbildung 77 Kapitel 5.8.8. n=3	186
Tabelle 43: Messwerte aus Abbildung 78 Kapitel 5.8.8. n=3	186

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Å	Angström (10^{-10} m)
Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Measurement)
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BS	Blockierungslösung (<i>Blocking Solution</i> [®]) von Candor Bioscience
cDNA	Englisch: <i>Copy</i> DNA / <i>complementary</i> DNA (komplementäre DNS)
C6	Variable major Protein Sequence E (VLsE) Epitop 6
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
ConA	Concanavalin A
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Elutionspuffer (Elution Buffer)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorbiver Test (<i>Ezyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
Endkonz.	Endkonzentration
ER	Endoplasmatisches Retikulum
f	Femto (10^{-15})
fTLI	Trypsinogen ähnliche Immunoreaktivität in Katzen (<i>Feline trypsinogen-like immunoreactivity</i>)
g	Gramm

GC	Gas-Chromatographie
h	Stunde
His	Histidin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IU	<i>International Units</i>
kDa	Kilodalton
L; l	Liter
LFA	<i>Lateral Flow Assay</i>
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
M	Mol/molar
mA	Milliamper
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
α-MP	α-Methylmannopyranose
MW	Englisch: <i>Molecular Weight</i> (Molekulargewicht)
N	Äquivalenzkonzentration
NaCl	Natriumchlorid
NC	Nitrocellulose
nt	Nukleotide
Ø	Durchmesser
OspC	Oberflächenprotein C (<i>Outer Surface Protein C</i>)
p	Piko (10^{-12})
p.a.	Reinheitsgrad von Chemikalien: <i>pro analysi</i>
PBS-Puffer	Phosphate-buffered saline-Puffer

PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
ProtA	Protein A
pI	Isoelektrischer Punkt
RfS	Reflektometrische Interferenz Spektroskopie
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Siemens
SAv	Streptavidin
sec	Sekunde
SPR	Oberflächen Plasmon Resonanz (<i>Surface Plamon Resonance</i>)
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TB-Medium	<i>teriffic broth</i> Medium
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Schmelztemperatur (englisch: <i>melting temperature</i>) PCR-Primer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TST	Tris-salt-Tween
U	Units
V	Volt
VlsE	<i>Variable major Protein Sequence</i> E
v/v	<i>Volume per Volume</i> (Volumen/Volumen)
w/v	<i>Weight per Volume</i> (Gewicht/Volumen)
DNA-Code	
A	Adenin
C	Cytosin

G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Ein-Buchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

1 Einleitung

In den letzten Jahren hat die rekombinante DNA Technologie ein weites Feld von Möglichkeiten eröffnet. Als ein Produkt haben sich Fusionsproteine als eine neue Klasse Biomoleküle mit multifunktionalen Eigenschaften entwickelt. Sie bestehen aus mindestens zwei oder mehr neu zusammengesetzten Proteindomänen. Dies geschieht durch die gemeinsame Expression der ausgesuchten Gene oder Genteile als Fusionsprotein. Durch gezielte Entfernung des Stopp-Codons hinter dem ersten Gen werden beide Gene so arrangiert, dass sie, als ein zusammenhängendes Gen, abgelesen werden. Es entsteht ein Hybridgen. Diese Hybridisierung kann gezielt erfolgen, durch Klonierung in einen Expressionsvektor, kann aber auch spontan erfolgen, z.B. durch Translokation von Genen auf Chromosomen. Das wohl bekannteste Fusionsprotein, welches durch natürliche Translokation entsteht, ist das *BCR-ABL*-Genprodukt. Es wird als Ursache der chronischen myeloischen Leukämie (CML) angesehen (Murken, Grimm, Holinski-Feder, 2006).

Fusionsproteine haben eine große Bedeutung in der Biotechnologie und in der Mikrobiologie. Sie können der Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Genprodukten dienen. Dabei kommen, als sogenannte Reporterproteine, oft fluoreszierende Proteine zum Einsatz (z.B. grün fluoreszierendes Protein GFP (Shimomura 2005)), die dann C- oder N-terminal mit dem zu untersuchenden Protein fusioniert werden. Zudem findet häufig die Verwendung von Protein-Tags statt. Diese werden meist zur Aufreinigung von Proteinen aus einer Matrix verwendet (z.B. GST-Tag (Chong et al. 1998)). Sie können aber auch eine gewollte Lokalisationszieländerung, durch Anheftung oder Entfernung von Signalsequenzen, innerhalb der Zelle hervorrufen (Alberts et al. 2011).

Viele Fragestellungen in der modernen Biologie sind fast ausschließlich über experimentelle Ansätze zu beantworten, welche den Einsatz rekombinant klonierter Transkripte umfassen. Der Bereitstellung spezifischer Proteine mit maßgeschneiderten Linker- oder Markerfunktionen, so genannte Funktions-Tags, kommt dabei eine immer größere Bedeutung zu. Dies gilt insbesondere für die disziplinübergreifende Forschung in der Grenzflächen- und Nanotechnologie und der molekularen Biologie, in der solche Werkzeuge eingesetzt werden. Beispiele möglicher Anwendungen für Fusionsproteine sind in den Bereichen der Protein-Protein-Interaktion zu finden. Zur Identifizierung interagierender Proteine können Techniken wie Co-Immunopräzipitation (Masters 2004), enzymgekoppeltem Immunabsorptionstest (ELISA; Goldsby et al. 2003) oder Two-Hybrid Assays

(Joung, Ramm, Pabo 2000), angewendet werden. Zudem spielt die Darstellung von Proteinbiochips (Jonkheijm et al. 2008) in der Biosensorik eine große Rolle. Und schlussendlich finden Fusionsproteine, durch die Verwendung von immunologischen Schnelltests, Anwendung in der Diagnostik im Human- und Veterinärbereich (Jonkheijm et al. 2008; Lueking, Cahill, Müllner 2005) sowie in der klinischen Therapie als wichtige Kategorie der Biopharmaka (Schmidt 2009; Chen, Zaro, Shen 2012).

Der Nachweis, bzw. die Konzentrationsbestimmung medizinisch relevanter Biomoleküle oder der spezifische Nachweis pathogener Keime und deren Bestandteile, sind eine wichtige Aufgabe in der klinischen Diagnostik, in der Veterinärmedizin und in der Lebensmittelkontrolle. Dabei gewinnen analytische Schnellverfahren zunehmend an Bedeutung. Um diese Assays allgemein verfügbar zu machen, ist ein einfacher Aufbau erforderlich. Die wichtigsten immunologischen Schnelltests sind sogenannte Streifen im Lateralfluss-Format (*Lateral Flow Assay*, LFA). Hierbei stellt eine poröse Membran den Assayträger dar. Weltweit werden derzeit mehrere hundert Millionen LFA zur medizinischen Diagnostik verkauft und der Markt unterzieht sich einem immer größer werdenden Wachstum. Niedrige Herstellungskosten machen den LFA zu einer idealen Plattform für die *Point-of-Care* Diagnostik. Derartige Formate werden auch von der World Health Organization (WHO) unterstützt. Vor allem müssen Analysemethoden in der *Point-of-Care* Diagnostik einfach in der Handhabung sein, sodass theoretisch jeder Laie sie ausführen kann (Luppa, Schlebusch, 2008). Dies setzt auch eine große Robustheit des Testes voraus, da er in fast jeder Umgebung durchgeführt werden können muss, wobei seine Aussagekraft nicht beeinflusst werden darf. Zudem müssen Tests dieser Art einfach zu interpretieren sein, wobei im besten Fall keine weitere Gerätschaft notwendig ist (Stürenberg, Junker, 2009; Junker, Schlebusch, Luppa, 2010)

1.1 Problemstellung und Idee des Forschungsvorhabens

Problematiken der *Point-of-Care* Diagnostik sind vor allem die höheren Reagenzienkosten und eine häufig methodisch bedingte, geringere analytische Sensitivität (Empfindlichkeit) und Spezifität (Genauigkeit). Auch der Probendurchsatz ist in der Regel deutlich geringer, als bei entsprechenden Labormethoden. Darüber hinaus stehen nur für einige Parameter entsprechende Schnelltestmethoden zur Verfügung (Stürenberg, Junker, 2009; Luppa, Schlebusch, 2008).

Idee der Arbeit ist daher, zum einen eine Steigerung der Empfindlichkeit durch Einsatz von Fusions- und Linkerproteinen, zum anderen die Integration eines Anreicherungsschrittes in den Analysenablauf. In einem Anreicherungsmodul soll der Analyt (z.B. Mikroorganismus, Droge, Hormon, Biomarkerprotein) zunächst über ein kleines Affinitätsmodul („Anreicherungsmodul“) auf Immunobasis ankonzentriert werden. Anschließend soll der Analyt in einem sehr geringen Probenvolumen schonend eluiert werden, wobei die Bindung des Antikörpers zum festen Träger des Affinitätsmoduls aufgehoben wird. Diese Idee kann durch den Einsatz von multifunktionalen, rekombinanten „Linkerproteinen“ verwirklicht werden, welche die Eigenschaften von zwei Funktionsdomänen vereinen.

Zu analytischen Testzwecken wurden in dieser Arbeit vorwiegend Biosensoren sowie ELISAs verwendet (Lequin, 2005). Ein Vorteil bei der Verwendung von Biosensoren besteht darin, dass die Interaktionspartner nicht mit einer Markierung versehen werden müssen, um eine Detektion hervorzurufen. Allerdings müssen aus diesem Grund alle Moleküle, die benötigt werden, auf eine möglichst schonende und ebenfalls räumlich ausgerichtete Art und Weise immobilisiert werden, um eine signifikante Detektion zu garantieren. Besonders wichtig ist bei diesem Aspekt die Immobilisierung von Antikörpern, da viele Bioaffinitätsstudien mindestens einen Antikörper zur Detektion bestimmter Analyten benötigen. Jedoch liegt gerade in der Immobilisierung der Antikörper ein großes Problem. So ist zum Beispiel bekannt, dass im Falle von ELISAs bei Immobilisierung von polyclonalen Antikörpern, mithilfe von hydrophoben Wechselwirkungen, nur 5-10% der Antikörper ihre Funktion erhalten. Bei monoklonalen Antikörpern bleiben weniger als 3% bindungsfähig. Das bedeutet, mindestens 90% der Antikörper degenerieren bei dieser Art der Immobilisierung. Zudem können auch die verbleibenden, funktionsfähigen Antikörper durch die Immobilisierung strukturell so verändert sein, dass ihre Affinität und Spezifität beeinflusst sein könnte (Butler et al., 1992).

Ebenfalls bei der kovalenten Immobilisierung kann es zu Beeinträchtigungen der Bindeeigenschaften von Antikörpern kommen (Engvall, Perlmann, 1971). Eine kovalente Immobilisierung kann über die Amino- sowie Carboxygruppen in den Aminosäureseitenketten der Antikörper erfolgen. Diese Gruppen sind innerhalb des Antikörpers statistisch verteilt, wodurch letztendlich die Orientierung des Antikörpers auf der Oberfläche durch eine kovalente Kopplung nicht beeinflussbar ist. Zudem spielen die Aminogruppen in der variablen Domäne des Fab-Teils eine wichtige Rolle in der Antigenbindung des Antikörpers (Lochspeich, 1998). Falls die kovalente Bindung in dieser

Region stattfindet, kann dies zu einem absoluten Funktionsverlust führen. Allerdings ist, wie oben bereits erwähnt, dieser Immobilisierungsschritt der limitierende Faktor. Aus diesem Grund sind universell anwendbare Methoden, basierend auf selbstorganisierenden Oberflächen, im Vorteil. Zu diesen gehören z.B. das Streptavidin-Biotin System. Daher scheint sich die Verwendung von Fusions- und Linkerproteinen zur Immobilisierung von Biomolekülen, als eine interessante Alternative zu bereits bestehenden Systemen darzustellen. Um den Problemen der Immobilisierung von Antikörpern entgegenzuwirken, wurden Linkerproteine entwickelt, um diese zielgerichtet auf Oberflächen zu immobilisieren und die Ausbeute an aktiven Antikörpern zu erhöhen. Dies ist im folgenden Kapitel 1.2 näher erläutert.

Zudem wurden zwei Fusionsproteine, für die Detektion von Antikörpern aus einer komplexen Matrix, entwickelt. Sie sollen zum einen, ein Oberflächenantigen präsentieren, an welches die zu detektierenden Antikörper anbinden, zum anderen eine Bindedomäne aufweisen, durch die eine gerichtete Immobilisierung auf einer Oberfläche möglich ist. Durch diese gerichtete Immobilisierung der Fusionsproteine soll eine erhöhte analytische Sensitivität (Empfindlichkeit) erreicht werden. Diese Fusionsproteine sind in den Kapiteln 1.3 näher erläutert.

1.2 Anreicherungsmodul und Regenerierbarkeit von Oberflächen

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Keusgen wurde die Idee entwickelt, durch die Fusionierung von zwei verschiedenen Proteindomänen ein bifunktionales Linkerprotein zu erhalten, welches in einem Anreicherungsmodul Anwendung finden kann. Das Linkerprotein mit dem Namen Concanavalin A-Streptavidin (ConA-SAv) soll als Verbindung zwischen einer mit Mannan beschichteten Oberfläche und einem biotinylierten Antikörper dienen. Von der ConA-Mannan-Bindung wird erwartet, dass sie durch Bindung eines thermodynamisch favorisierten Monosaccharids, welches mit dem Mannan um die ConA-Bindestelle konkurriert, gelöst werden kann. Die Applikation eines Monosaccharids, gelöst in einem Puffer, sollte auf diese Weise zur Entfernung des ConA-SAv-Linkerproteins von der Oberfläche führen. Dadurch soll innerhalb eines dreidimensionalen Filters ein Anreicherungsmodul verwirklicht werden können, wobei das Linkerprotein in Kombination mit einem biotinylierten Antikörper, den Analyten spezifisch aus einer

Probelösung binden soll. Im Anschluss soll der gesamte Komplex schonend eluiert und für weitere Untersuchungen verwendet werden können.

Das Linkerprotein ConA-SAv besteht aus Concanavalin A (ConA) und einer Streptavidin Bindedomäne. ConA ist ein Lektin, gewonnen aus der Pflanze *Canavalia ensiformis* (Agrawal, Goldstein 1972). Aufgrund seiner Fähigkeit bestimmte Kohlenhydrate zu binden, hat ConA eine weit verbreitete Applikationsanwendung in der Biochemie (Betton 1976) und in der Affinitätschromatographie, wo es für die Aufreinigung von Glykoproteinen und Kohlenhydraten verwendet wird. ConA zeigt eine hohe Bindungsaffinität zu Zuckerverbindungen wie α -D-Glukose und verwandte Polysaccharide wie Dextran und Mannan, wobei es keine enzymatische Aktivität aufweist (Goldstein, Poretz 1986). Es wurde bereits gezeigt, dass ConA stabile Zucker-Lektin Komplexe ausbildet (Keusgen, Glodek, Milka, Krest, 2000). Zudem wurde es als Linker zwischen Mannan und anderen Enzymen eingesetzt (Milka et al., 2000), da es zwei gleiche Bindestellen besitzt (Mandal und Brewer, 1993). Die zweite funktionale Domäne des Linkerproteins ist die Streptavidin Bindedomäne (SAv). SAv wird von dem Bakterium *Streptomyces avidinii* produziert und weist eine homotetramere Struktur auf (Weber, Ohlendorf, Wendoloski und Salemme, 1989; Claire, Chivers, Apurba, Koner, Edward, Lowe, Howarth, 2011). Jede Untereinheit hat eine hohe Affinität zu Biotin ($K_a \sim 10^{14} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$) (DeChancie, Jason; Houk, 2007), welches bis jetzt die stärkste bekannteste, nicht kovalente Bindung darstellt. Durch seine fast neutrale Ladung ($pI \sim 7.0$), über die gesamte Proteinoberfläche, zeigt SAv nur eine geringe unspezifische Bindeaktivität. Zudem ist SAv nicht glykosiliert, was eine unspezifische Interaktion mit ConA unwahrscheinlich macht. Das Streptavidin-Biotin System wird bereits in vielen biochemischen Applikationen verwendet sowie in der Immunologie, wo es in *Lateral Flow Assays* und in der Affinitäts-Chromatographie Verwendung findet (Chodosh, Lewis, Buratowski, Stephen, 2001). Eine nähere Betrachtung der beiden Proteindomänen findet nochmal in Kapitel 1.2.1 und 1.2.4 statt.

Durch die zwei funktionalen Domänen ConA und SAv soll das Linkerprotein eine reversible Immobilisierung von biotinylierten Molekülen, z.B. Antikörpern, auf einer mit Zucker funktionalisierten Oberfläche ermöglichen. Diese reversible Bindung ermöglicht die Verwirklichung eines Anreicherungsmoduls für Immunoassays. Ein schematischer Ablauf ist in Abbildung 1 dargestellt.

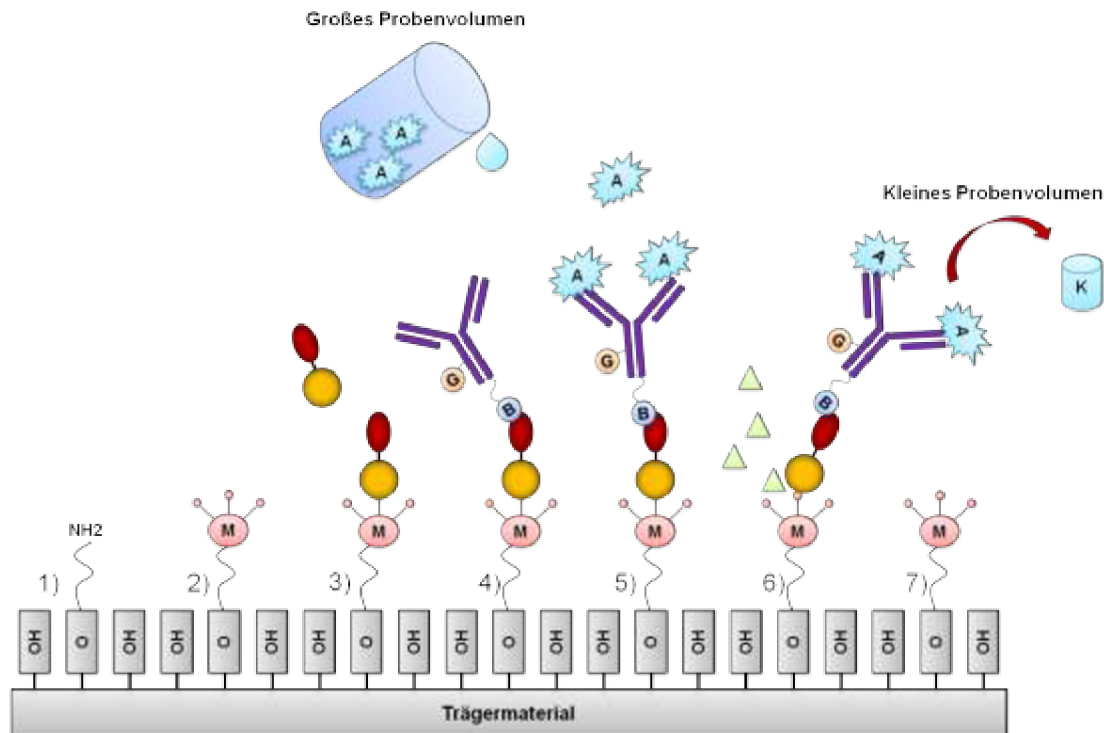


Abbildung 1: Schematischer Ablauf einer Analyse, beginnend bei der Funktionalisierung des Trägermaterials, die den Kern des Anreicherungsmoduls darstellt. Schritt 1: Etablierung von NH_2 -Gruppen auf dem Trägermaterial. Schritt 2: Oberflächenfunktionalisierung mit einem Zucker z.B. Mannan oder Dextran. Schritt 3: Anbindung des Linkerproteins ConA-SAv. Schritt 4: Zugabe des biotinylierten Antikörpers. Schritt 5: Applikation des Analyten in einem großen Volumen. Schritt 6: Ablösung des Linkerprotein-Antikörper-Analyt Komplexes mit einem konkurrierenden Zucker in einem kleinen Volumen, Schritt 7: Regenerierte Oberfläche mit Möglichkeit zur Neubeladung der Oberfläche.

Als Anreicherungsmodul kann ein mit Zucker funktionalisierter, dreidimensionaler Polymersinterkörper verwendet werden (Abb. 1, Punkt 2). Auf diesen kann das Linkerprotein immobilisiert werden (Abb. 1, Punkt 3). Der Polymersinterkörper kann durch seine dreidimensionale Struktur eine hohe Anzahl von Bindestellen exponieren. Auf das Linkerprotein wird nun der biotinylierte Antikörper gebunden (Abb. 1, Punkt 4) und das Affinitätsmodul kann verwendet werden. Zu Beginn des Analysevorgangs kann zunächst ein relativ großes Probenvolumen (einige 100 μl bis einige ml) auf das Affinitätsmodul gegeben werden (Abb. 1, Punkt 5). Nun können die in der Probe enthaltenen Analytmoleküle an die Antikörper binden. Ist die Probe abgeflossen, so wird durch die Zugabe einer geringen Menge einer Elutionslösung der Analyt samt Antikörper eluiert (Abb. 1, Punkt 6) und dem nachfolgenden Immunoassay zugeführt. Theoretisch kann nun das Anreiche-

rungsmodul wieder verwendet werden, indem es mit neuem Linkerprotein und biotinyliertem Antikörper beladen wird (Abb. 1, Punkt 7).

Mit Hilfe dieses universellen Linkerproteins kann jeder beliebige biotinylierte Antikörper auf der Oberfläche des Affinitätsmoduls immobilisiert und dessen spezifischer Analyt angereichert werden, was einen weiten Anwendungsbereich dieser Technologie ermöglichen soll.

Im Hinblick auf zwei-dimensionale Oberflächen der Biosensoren bietet diese Idee ebenfalls einen großen Vorteil. Hier kann dieses System mit ConA genutzt werden, um Oberflächen mehrfach verwendbar zu machen. Durch die schonende Eluierung, mittels einer Zuckerlösung, soll die Oberfläche nicht denaturiert oder destabilisiert werden. Dadurch sind eine erneute Beladung mit Linkerprotein und eine weitere Benutzung des Chips/Prismas möglich. Dies bietet eine erheblich kostengünstigere Nutzung der Biosensoren.

In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen biologischen Komponenten des Anreicherungsmoduls nochmal näher beleuchtet.

1.2.1 Concanavalin A

Concanavalin A (ConA), ein Lektin, wurde 1919 von James B. Sumner entdeckt. Diese Isolation von ConA aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.; Fabaceae) stellte die erste Isolation eines Hämagglutinins dar. Sumner und Howell veröffentlichten 1936 die Erythrozyten- und Hefezellen agglutinierende Wirkung von ConA und deren Hemmung durch Saccharose. Diese Entdeckung führte zur Theorie, dass die Hämagglutination durch Bindung von Proteinen, an Zuckerstrukturen auf der Oberfläche von Zellen, verursacht wird. Bei der Bildung des Zucker-Protein-Komplexes werden Wassermoleküle von den polaren Gruppen der Bindetasche im Protein und um den Zucker verdrängt. Stattdessen werden neue Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zucker und Protein gebildet und van-der-Waals-Kräfte kommen zum Tragen, wodurch die Bindung zwischen Zucker und Protein zustande kommt (Quioco 1986).

Lektine spielen, wie oben schon erwähnt, eine wichtige Rolle bei Zellagglutination, Toxizität, Antiproliferations- und Antitumoreffekten und können antifungal und antiviral wirken (Yan et al. 2010). Sie finden vielfältige Anwendungen in der Medizin und Biologie.

Sie wurden eingesetzt, um rote Blutkörperchen zu typisieren (Nakajima et al., 1988), als Mitogene (Licastro et al. 1991), um Kohlenhydrate auf Zelloberflächen zu untersuchen (Clark 1991) und zur Reinigung von Glykoproteinen (Delanghe et al. 1989). Lektine besitzen verschiedene Zuckerspezifitäten. ConA aus *Canavalia ensiformis* ist α -D-Mannose- und α -D-Glukose-spezifisch (Kennedy et al. 1995). Besonders hohe Affinität besteht zu 3,6-di-O-(α -D-mannopyranosyl)-D-mannose-Kernstrukturen (van Dongen, Heck 2000). Die Regeneration des gebundenen ConA auf einer Dextran- oder Mannanoberfläche kann durch die Zugabe von α -D-Methylmannopyranose realisiert werden. Aufgrund dieser reversiblen Bindeeigenschaften des ConA zu verschiedenen Zuckern eignet es sich gut als Bindepartner für das bifunktionale Linkerprotein.

ConA ist ein homotetrameres Protein, das vor allem in den Kotyledonen der Jackbohne *Canavalia ensiformis* gebildet wird und eine wichtige Rolle beim Anlegen von Proteinreserven spielt. ConA besitzt eine homotetramere Struktur bei einem pH von 7 und beinhaltet zwei Metallionen, Ca^{2+} und Mn^{2+} , die an der Ausbildung der Bindetasche beteiligt sind. Die primäre Struktur, ein Monomer, besteht aus 237 Aminosäuren und unterzieht sich einer Permutation nach der Translation (Montanier, Flint, Bolam et al. 2010; Min, Dunn, Jones 1992).

Zunächst findet die Translation eines „Precursor“-Proteins am rauen Endoplasmatischen Reticulum (ER) statt. Der Precursor wird durch das ER/Golgi-System transportiert, wobei eine Glykosylierung stattfindet. Das Endprodukt heißt pre-pro-Concanavalin A, ist kuppel-oder hauben-förmig, $42 \times 40 \times 39$ Å groß und hat eine Molekularmasse von 34 kDa (Herman et al., 1985). Nach Glykosylierung sammeln sich die Precursorproteine im vakuolären Kompartiment in Proteinkörperchen (Herman und Shannon, 1984) und bilden schließlich Protein-Speichervakuolen in den Kotyledonen. Diese Strukturen sind spezielle membranumhüllte Speicherorganellen, in denen Speicherproteine akkumulieren. Die Kohlenhydratkette vom Oligomannose-Typ am pre-pro-ConA ist wegweisend für den Transport, der die Proteine durch die einzelnen Stationen des ER/Golgi-Systems, zu den Proteinkörperchen (Faye, Chrispeels, 1987) führt.

Das pre-pro-ConA wird in den Proteinkörperchen durch zwei endoproteolytische Eingriffe posttranslational modifiziert. Der gereifte Aminosäurestrang besteht aus den Resten 164-281, gefolgt von 30-148. Diese posttranslationale Modifikation startet mit der Entfernung der N-terminalen Signal Sequenz der ersten 29 Aminosäuren. Gefolgt von mehre-

ren Schnitten an der Aminosäure Asparagin an den Positionen 148, 163 und 281, erfolgt die Transposition und die Ligation der Reste 164-281 und 30-148, durch Bildung neuer Peptidbrücken. Das bedeutet, dass ein kleiner Teil der Aminosäuresequenz im Zentrum des pre-pro-ConA „ausgeschnitten“ wird, welcher auch die Kohlenhydratseitenkette enthält. Die beiden resultierenden Stücke werden in einem Ligationsschritt wieder zusammengefügt. Erst dieses nicht-glykosylierte ConA von 30 kDa stellt die gereifte Version des ConA dar (Chrispeels 1986). Min et al. (1992) fanden jedoch heraus, dass auch die deglykosylierte Form des pre-pro-ConA funktional ist. Das bedeutet, dass die Transposition der Aminosäurekette vor der Religation ist nicht notwendig ist, um ein aktives Lektin zu erhalten (Min et al. 1992). Für die Klonierung wurde die pre-pro-ConA Form des Concanavalin A benutzt. Die pre-pro-ConA Form hat zudem die positive Eigenschaft, dass sie nicht zur Bildung von Homotetrameren neigt (Min et al. 1992). Das native ConA liegt bei einem pH von über 7 als Tetramer vor und unterhalb von pH 5 als Dimer (McCubbin, Kay 1971). Das Tetramer wird gebildet, indem sich zwei Dimere über ihr zwölfsträngiges β -Faltblatt assoziieren (Reecke et al. 1975). Eine Vernetzung der Proteine untereinander könnte Probleme bei der Oberflächenfunktionalisierung der Glaschips und Goldprismen verursachen. Da die pre-pro-ConA Form zur Klonierung verwendet wurde, sind allerdings dadurch alle folgenden Angaben der Bindungseigenschaften und Struktur, die hier gegeben werden, zu allererst auf die mature Form des ConA bezogen, da es von der pre-pro-ConA Form keine genaue Strukturaufklärung gibt.

Die Metallionen-Bindestelle jedes Monomers ist ca. 20 Å von der Position der Polysaccharid Bindestelle entfernt. Die hydrophile Bindestelle ist eine tiefe Tasche, welche durch hydrophobe Reste abgegrenzt wird (Kalb, Levitzki 1968). Bei ConA komplexiert das Ca^{2+} -Ion mit den Aminosäuren Asp10, Asp19, Tyr12, Arg228 sowie zwei H_2O -Molekülen, welche über Wasserstoffbrücken an Asn14 und Asp208 gebunden sind. Das zweite Metallion ist ein Mn^{2+} , welches ebenfalls über Asp10 und Asp19 sowie über die Aminosäuren Glu8 und His24 und zwei H_2O komplexiert ist. Ohne die Metallionen ist das Monomer teilweise entfaltet. Man spricht dann von der „unlocked“-Konformation, im Gegensatz zur „locked“-Konformation mit gebundenen Metallionen. Die „locked“-Konformation und die „unlocked“-Konformation befinden sich in einem Gleichgewicht. In der metallionenfreien Variante befinden sich meist 10% der ConA-Proteine. In Anwesenheit von hohen Konzentrationen an Mannose steigt der Prozentsatz (Brown et al. 1982). Denselben Effekt haben Calcium und, weniger stark ausgeprägt, Cadmium. Sie

stabilisieren die „locked“-Konformation, was mit einer *trans*- zu *cis*-Isomerisierung der Peptidbindung von Ala207 und Asp208 einhergeht. Van Dongen und Heck zeigten, dass auch das metallionenfreie apo-ConA spezifische Zuckerbindungen eingehen kann (van Dongen, Heck 2000).

1.2.2 Mannan

Mannan ist ein komplexes Polysaccharid, dass in den Zellwänden von Pilzen vorkommt. *Saccharomyces cerevisiae*, die Bäckerhefe, besitzt eine breite Palette an Glykokonjugaten

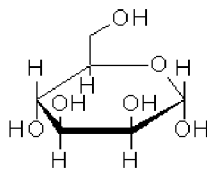


Abbildung 2: D-Mannose

wie z.B. Proteine, die N- oder O-glykosidisch gebundenes Mannan tragen. O-glykosidisch gebundenes Mannan ist an einen Serin- oder Threonin-Rest angehängt, während N-glykosidisch gebundenes Mannan an Asparagin gebunden ist. In Pflanzen kommt Mannan als lineares Polymer des Zuckers Mannose vor. Die Pflanzenmannane sind durch β 1,4-Bindungen miteinander verbunden und sind eine Speicher-

form der Polysaccharide (Moreira, Filho 2008). Zur Funktionalisierung der Oberflächen wurde Mannan verwendet welches, mittels der Methode nach Haworth (1937, alkaline Extraktion), aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen wurde. Bei Aufreinigung mit dieser Methode werden die glykosidisch gebundenen Proteine nicht entfernt.

1.2.3 Dextran

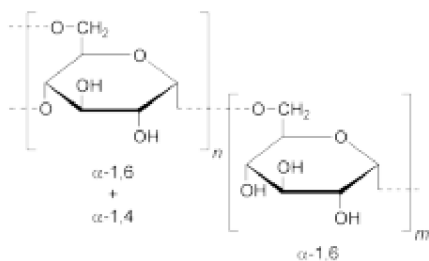


Abbildung 3: Dextran Molekül

Dextran ist ein komplexes Polysaccharid aus verzweigten Glukose-Ketten, wobei der Hauptstrang aus α -1,6 - glykosidisch verbundenen Molekülen besteht und die Seitenketten mit α -1,4-Bindungen verzweigen. Natürliche Dextrane besitzen Molekülmassen zwischen 10.000 und 50.000.000 Da. Sie werden von Bakterien der Gattung *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* und *L. dextranicum*) mittels Enzymen außerhalb der Zellen (extrazellulär) aus Saccharose hergestellt.

Dextran findet Anwendung in vielen Applikationen als Volumenfüller, stabilisierendes Reagenz, Matrix Komponente (VanTomme, Hennink 2007) sowie in der Simulation von Erythrozyten Aggregation in der kardiovaskulären Forschung (Ong et al. 2010). Im vorliegenden Forschungsvorhaben wurde Dextran in Form von Sephadex[®] Beads für die Co-Immunopräzipitation verwendet (Axen, Porath 1966, Porath Axen 1976) sowie in Lösung zur Funktionalisierung zweidimensionaler Biosensorchipoberflächen.

1.2.4 Streptavidin

Streptavidin (SAv) ist in der Quartärstruktur ein homotetrameres Protein von ca. 60 kDa Molekulargewicht, welches aus *Streptomyces avidinii* stammt. Zunächst wird ein Vorläuferprotein von 159 Aminosäuren gebildet. Nach Prozessierung bleibt ein Kernprotein aus den Aminosäuren 18-139 übrig. Die Sekundärstruktur jedes Monomers besteht aus acht antiparallelen β -Strängen, die sich zu einem β -Barrel anordnen (Hendrickson et al. 1989). Aufgrund von starken van-der-Waals-Wechselwirkungen lagern sich zwei dieser β -Barrel Monomere zusammen und bilden ein Homodimer. Zwei Homodimere bilden aufgrund von van-der-Waals-Kräften und elektrostatischen Wechselwirkungen, die schwächer ausfallen als zwischen den Monomeren, ein Homotetramer. Ohne Biotin sind an den Aminosäuren Asn23, Tyr43, Ser27, Ser45, Asn49, Ser88, Thr90 und Asp128 im Inneren der Bindungstasche, Wassermoleküle mittels Wasserstoffbrücken gebunden (Hendrickson et al. 1989). Bei Bindung von Biotin kommt es zur Verdrängung der Wassermoleküle aus der Bindetasche und zur Etablierung neuer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Biotin und dem Valeriansäureteil des Biotins.

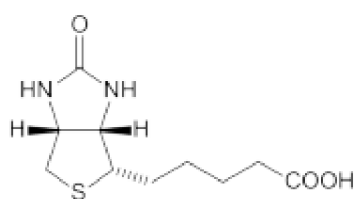


Abbildung 4: Biotin-Molekül

Zudem tragen van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den vier in der Bindetasche vorhandenen Tryptophan-Resten (Thr90) mit dem Biotin, zur Bindung dessen bei. Dabei stammt jeweils ein Tryptophan-Rest von einem benachbarten Monomer. Letztlich kommt es zur Konformationsänderungen im SAv, welche thermodynamisch relevant sind. Hierdurch entsteht die außergewöhnlich starke SAv-Biotin-Bindungen ($K_a \sim 10^{14}$ - 10^{15} M^{-1}). Sie gehört zu den stärksten, nicht-kovalenten Bindungen in der Natur (deChancie, Houk 2007; Reznik et al. 1996). Die Bindung stabil über einen großen pH-Wert- und Temperaturbereich (Holmberg et al. 2005) hinweg. Die thermale

Denaturierung von SAV findet bei 75°C statt. Bei Biotin-Sättigung erhöht sich die Denaturierungstemperatur auf 112°C (González et al. 1997). Anstelle von SAV wurde früher Avidin verwendet. Der Einsatz dieses Proteins ist von vielfältigen, unspezifischen Wechselwirkungen begleitet. Diese Effekte werden auf Glykosylierungen am Avidin zurückgeführt, die dem bakteriell exprimierten SAV fehlen (Wilcheck, Bayer 1990).

1.3 Fusionsproteine zur Sensitivitätssteigerung von Immunoassays

1.3.1 Lyme-Borreliose (*Erythema chronicum migrans*)

Im Zuge der vorangegangenen Arbeiten wurden spezifische Fusionsproteine für Applikationen in der Borreliosediagnostik im Human- sowie Veterinärbereich entwickelt. Die Lyme Borreliose ist eine systemische Erkrankung, hervorgerufen durch die Infektion mit der Spirochäte *Borrelia burgdorferi*, die durch Zecken übertragen wird. Mit in Deutschland 60.000 bis 100.000 Neuinfektionen im Jahr gehört sie zu einer der häufigsten, durch Zecken übertragenen Erkrankungen. Sie führt zu schweren Enzephalitiden und reaktiven Arthritiden. Ein sicherer Nachweis einer Infektion mit Borrelien kann nur über Antikörper im Blut erbracht werden. Die Lyme-Borreliose muss durch Antibiotikumgabe behandelt werden, wobei eine Therapie in der Frühphase der Erkrankung in der Regel am erfolgreichsten ist (Krauss et al. 2004).

Zecken gehören zur Klasse der Spinnentiere und zur Unterklasse der Milben. In Deutschland zählt zu den bekanntesten Vertretern der Gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*). Zecken entwickeln sich in mehreren Entwicklungsstadien mittels Häutung von der Larve, über die Nymphe, zur adulten Zecke. Vor jeder Häutung benötigt die Zecke eine Blutmahlzeit, für die sie Nagetiere, Vögel und mittelgroße und große Warmblüter, aber auch Eidechsen suchen. Für eine Blutmahlzeit bohren Zecken ihre Mundwerkzeuge in die Haut ihres Wirtes. Beim mehrere Tage dauernden Saugakt können die Zecken von bereits infizierten Wirten Erreger aufnehmen, oder, falls sie Träger von Krankheitserregern sind, Erreger auf den Wirt übertragen. Dies geschieht über den Speichel und Magensaft der Zecke. Der Borreliose-Erreger kann so, während des Saugaktes, von der Zecke in den menschlichen Blutkreislauf gelangen (Krauss et al. 2004).

Als Erreger der Lyme-Borreliose bei Menschen gelten vor allen 3 Arten der Gruppe *Borrelia burgdorferi* sensu lato, nämlich *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*

und *B. afzelii* (Tilly, Rosa, Stewart 2008). Die Benennung geht auf Willy Burgdorfer zurück, der das Bakterium 1982 erstmals isolierte.

Spirochäten sind aktiv bewegliche, schraubenförmige, gramnegative Bakterien sowie *Borrelia burgdorferi* sensu stricto auch. Das Bakterium hat einen Durchmesser von etwa 0,3µm und besitzt eine Länge von ca. 10-20µm. Ein Flagellenbündel dient der Fortbewegung (Motaleb 2000). Je nach Phase des Infektionszyklus verändert sich die Zusammensetzung der Zellwand und der äußeren Membran. Zudem kann das Bakterium auch unter Antibiotikungabe als kugelige L-Form (Brorson 1997) in Zellen oder dem extrazellulären Matrixraum überleben, was eine Behandlung und dauerhafte Heilung der Krankheit erschwert (Burgdorfer 1982).

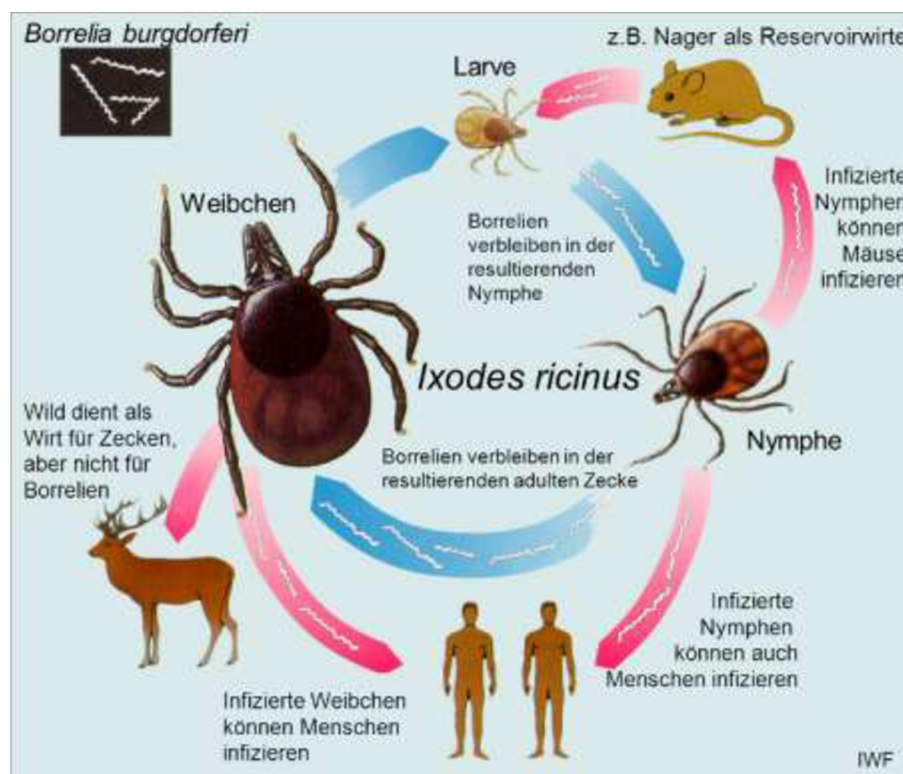


Abbildung 5: Übertragungszyklus des Erregers der Lyme-Borreliose (Quelle IWF, modifiziert). Durch Zeckenstiche infizierte Menschen sind für das Bakterium eine Sackgasse, d. h. der Mensch stellt das Ende der Infekt-Kette dar.

Als *Borrelia burgdorferi* sensu lato wird eine Reihe nah verwandter Borrelien bezeichnet, die in Zecken leben und Säugetiere als Wirt annehmen. Wie oben schon erwähnt führen insbesondere drei Arten zu einer Lyme-Borreliose des Menschen, mit unterschiedlicher Ausprägung. So geht eine Infektion mit *B. burgdorferi* sensu stricto häufig mit Arthritis

einher, während bei *B. garinii* neurologische Symptome und bei *B. afzelii* Hautveränderungen typisch sind. Das Verbreitungsgebiet *Borrelia burgdorferi* sensu lato erstreckt sich über die ganze nördliche Hemisphäre von Europa, Asien und Nordamerika. In Nordamerika dominiert *B. burgdorferi* sensu stricto. In Europa sind *B. afzelii* und *B. garinii* am häufigsten, wobei sowohl die Durchseuchung der Zecken, als auch die Verteilung der Arten regional stark variiert (Rauter, 2005).

1.3.1.1 Immunologische Detektion von Borreliose im Blutserum

Sobald der Borreliose-Erreger mit dem Blut des Wirtes in Kontakt kommt, verändert sich dessen Oberflächenstruktur und spezifische Proteine werden auf der Bakterienoberfläche präsentiert (Norris 2006). Gegen diese *in vivo* Antigene bildet der infizierte Körper Antikörper. In der sogenannten IgM und IgG Antwort des infizierten Individuums treten einige Frühmarker besonders hervor. Hierbei ist vor allem das Oberflächenstrukturprotein C (OspC) zu nennen sowie das Genospezies übergreifende *in vivo* Protein VlsE (*Variable major protein like sequence E*).

Aus diesem Grund wurden Fusionsproteine entwickelt, die diese spezifischen Proteine der Bakterienoberfläche, in Kombination mit dem Protein ConA nachahmen, um das Antigen gerichtet auf einer Zuckeroberfläche immobilisieren zu können. Zum Nachweis der Antikörper gegen Borrelien wurden zunächst von den herstellenden Firmen lediglich Vollantigene verwendet. Wegen der Erregerheterogenität werden allerdings Antigene gesucht, welche die Antikörper gegen möglichst viele Borrelienstämme erkennen können. Aus diesem Grund fokussiert sich die Forschung auf rekombinante *in vivo* Antigene (Lawrenz et al. 1999). Vorteile der rekombinanten Herstellung sind unter anderem, dass nur spezifische Antigen-Epitope verwendet werden können und auf kreuzreagierende Antigene verzichtet wird. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Konzentration der einzelnen Antigene variiert werden kann und man z. B. für den IgM-Test eine andere Mischung und Konzentration verwenden kann, als für den IgG-Test. Des Weiteren besteht die Möglichkeit Antigene verschiedener Borrelienstämme zu kombinieren.

Auch im Bereich der Borreliosediagnostik kann die Verwendung von 3D-Polymersinterkörpern, in Kombination mit Fusionsproteinen, einen erheblichen Fortschritt im Bereich der Nachweisgrenze erbringen. Durch die theoretisch höhere Sensitivität, aufgrund der erhöhten Zahl immobilisierter Antigene im Polymersinterkörper, im

Vergleich zum ELISA, sollte sich das diagnostische Fenster (Zeitraum zwischen Infektion und nachweisbarer Antikörper) verkleinern und eine Therapieentscheidung früher möglich sein. Der direkte Erregernachweis ist sehr aufwändig und weist, je nach Fragestellung, nur eine geringe Sensitivität auf (Aguero-Rosenfeld et al 2005).

1.3.1.1.1 Oberflächen Protein C (Outer Surface Protein C)

Das Oberflächen Protein C (OspC) ist ein spezifisch ausgeprägtes Lipoprotein, auf der Oberfläche der Borrelien. Die exprimierte Menge an OspC nimmt zu, sobald das Bakterium den Verdauungstrakt der Zecke verlässt und in die Speicheldrüsen wandert, um somit den Wirtswechsel vollziehen zu können. Dies weist auf eine mögliche Funktion von OspC bei der Anhaftung an die Speicheldrüse der Zecke hin. *In vivo* Untersuchungen in Ratten haben diese Anpassung bestätigt (Pal et al. 2004).

Die Frühphase der Infektion im Menschen ist durch die IgM Antwort gekennzeichnet. Hier werden zuerst vor allem Antikörper gegen das Oberflächen Protein C (OspC) gebildet, was dieses Protein zu einem hervorragenden Part in der Früherkennung der Borreliose diagnostik macht. Das Gen von OspC wurde in Volllänge, mittels Linkers, C-terminal an die Gensequenz von ConA kloniert. Daraus ergibt sich ein Fusionsprotein mit den Bindedomänen von ConA und OspC. Ein Schema des Assay Modells findet sich in Kapitel 5.5.3.

1.3.1.1.2 Variable major protein like sequence E (VlsE)

Sobald das Bakterium den Wirtswechsel vollzieht und aus der Speicheldrüse der Zecke in den menschlichen Körper übergeht, wird das Protein „*Variable major protein like sequence E*“ (VlsE) in erhöhtem Maße exprimiert (Hudson et al. 2001). Die IgG-Antikörperbildung des Wirtes, nach einer Infektion mit Borreliose, beginnt in der Regel später. Aber abweichend davon sind die VlsE-IgGs oft schon zeitgleich mit der IgM-Antikörperantwort im Serum nachweisbar.

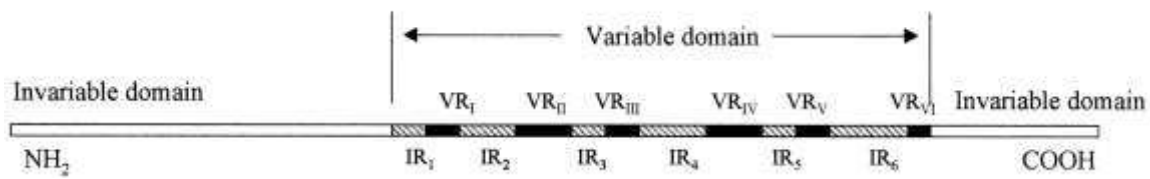


Abbildung 6: Stilisierte Karte des VlsE Gens. Das VlsE Gen besteht aus je einer invariablen Domäne am Amino- und am Carboxyl-Terminus. Zwischen ihnen befindet sich die variable Domäne. Diese beinhaltet 6 variable Regionen namens VRI bis VRIV sowie 6 invariable Teilbereiche namens IR1 bis IR6 (nach Liang et al. 2000). Die IR6 Domäne hat sich in Gensequenzanalysen als die konservierteste Region in der Familie der Spirochaetaceae herausgestellt.

VlsE ist ein hoch variables Protein innerhalb der Familie der Borrelien, da es den Mechanismus der Genkonversion vollführt. Dennoch haben sich 6 relativ gut konservierte Domänen herauskristallisiert, die für die Herstellung eines funktionalen Epitops herangezogen werden können. Eine dieser invariablen Regionen, namens IR6, zeigte eine hohe Antigenreaktivität und eine hohe Sequenz-Gleichheit innerhalb der Borrelien Genotypen und Stämme (Liang 2000, Alvarez et al. 1999). Aus dieser invariablen Region IR6 wurde das Gen für das Peptid C6 entnommen und mittels eines kurzen Linkers C-terminal an die Gensequenz von ConA kloniert. Aus dieser Fusion ergibt sich ein Protein bestehend aus der ConA-Bindedomäne und dem C6-Epitop. Ein Schema des Assay Modells findet sich in Kapitel 5.6.3.

Beide vorgestellten Proteine (ConA-OspC und ConA-C6) sollten in der Lage sein, sich auf einer Zuckeroberfläche immobilisieren zu lassen und die spezifischen Antikörper, welche gegen OspC und VlsE gerichtet sind, mit hoher Ausbeute aus der Matrix Blut, zu binden. Dadurch kann eine Quantifizierung der Antikörper erfolgen, wodurch eine Borreliose Erkrankung im Frühstadium schnell und unkompliziert diagnostiziert werden kann.

1.3.2 Pankreatitis und Pankreasinsuffizienz im Veterinärbereich

Die Bauchspeicheldrüse ist nicht nur bei Menschen ein Organ mit vielfältigen Funktionen, sondern auch bei Katzen und Hunden. Sie produziert den Bauchspeichel, der verschiedene Verdauungsenzyme enthält und gibt diesen in den Zwölffingerdarm ab. Zudem

werden in den Langerhans-Inseln die Hormone Insulin und Glukagon gebildet. Die Langerhans Inseln bestehen aus B-Zellen, die Insulin bilden, und aus A-Zellen, die für die Bildung von Glukagon verantwortlich sind. Insulin ist in der Lage den Blutzuckerspiegel zu senken, während Glukagon diesen erhöht. Somit führt eine Unterfunktion oder auch eine Entzündung dieser Zellen, zu einer Störung des Blutzuckerspiegels, bis hin zu einer chronischen Diabetes Erkrankung (Mayerle 2013).

Die Bauchspeicheldrüse hat normalerweise eine wichtige Funktion für die Verdauung, da sie Enzyme bildet, welche die Nahrungsbestandteile wie Fett, Kohlenhydrate und Eiweiß in kleinste Bausteine aufspalten. Fehlen diese Verdauungsenzyme, durch eine chronische Pankreatitis, hat dies zur Folge, dass der Darm der Katze die Nahrung nicht richtig verwerten kann. Die erkrankte Katze sieht daher meist mager aus und hat struppiges, glanzloses Fell. Der Kot ist infolge der unzureichenden Verdauung bei der Bauchspeicheldrüsenerkrankung häufig hell und fettig.

Eine akute Pankreatitis kann in den meisten Fällen, bei zeitnaher Diagnose, behandelt werden, wobei sich das Bauchspeicheldrüsengewebe meist vollständig erholen kann

(Frossard et al. 2008; Huber, Schmid 2007).

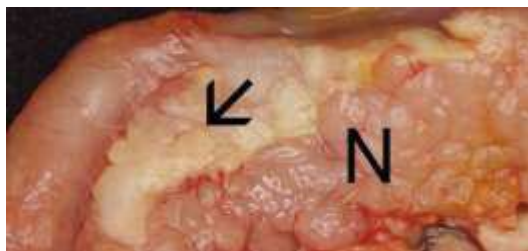


Abbildung 7: Makroskopische Bild von Pankreasgewebe. N: nicht pathologisches Gewebe; Pfeil markiert Gewebe mit akuter Pankreas Nekrose. Quelle: Laboklin GmbH & CoKG

Bei der chronischen Form kann der Krankheitsverlauf nur abgemildert werden. Die Ursache einer Pankreatitis bei der Katze ist in den meisten Fällen (rund 90%) unklar. Es sei denn, die Katze leidet unter Tumoren in der Bauchspeicheldrüse oder einer Unterkühlung.

Beides kann zu einer Pankreatitis bei der Katze führen. Auch einige Virusinfektionen und Bakterieninfektionen, verschiedene Me-

dikamente sowie Verletzungen, zum Beispiel nach einem Sturz, können eine Pankreatitis bei der Katze nach sich ziehen. Weiterhin tritt eine Pankreatitis bei der Katze im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen auf, wie eine Entzündung der Gallenwege, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Nierenschwäche oder Diabetes mellitus.

Katzen mit einer akuten Pankreatitis sind meist apathisch, erbrechen oft und haben Bauchschmerzen. In der Regel zeigen sie keinen Appetit. Bei einer chronischen Bauchspeicheldrüsenerkrankung stehen Abmagerung, Durchfall und Blähungen im Vorder-

grund. Jedoch treten die Symptome nicht verbindlich auf und deuten, wenn vorhanden, zunächst nur auf einen harmlosen Magen-Darm-Infekt hin, was die Diagnose der Bauchspeicheldrüsenentzündung erschwert.

Eine zuverlässige Diagnose einer Pankreatitis sowie einer Pankreas-Insuffizienz ist daher unerlässlich und kann über den TLI-Wert (Trypsin-ähnliche Immunoreaktivität) erreicht werden. Die Verdauungsenzyme werden überwiegend in inaktiven Vorstufen gebildet, um das Organ vor einer Eigenverdauung zu schützen. Durch Schädigungen des Pankreasparenchyms kommt es zu einer gesteigerten und fehlerhaften Freisetzung der Enzyme und als Folge davon werden das Pankreas- und das angrenzende Fettgewebe zerstört. Bei akuter Pankreatitis liegt eine von neutrophilen Granulozyten dominierte Entzündungszellinfiltration mit Nekrosen vor. Die Nekrosen des peripankreatischen Fettgewebes stellen sich als derbe, weiße Knötchen dar, die infolge einer Einlagerung von Kalziumsalzen häufig mineralisieren. Bei chronischer Pankreatitis hingegen dominiert eine lymphoplasmazelluläre Entzündung, daneben kommt es zur Atrophie von Pankreasparenchym mit nachfolgender Fibrose, bis hin zur Pankreaszirrhose (Braganza et al. 2011).

1.3.2.1 Immunologische Detektion von *feline* trypsinogen-like immunoreactivity (fTLI) im Blutserum

Als wichtigster Wert für eine Pankreasinsuffizienz kann die sogenannte fTLI (*feline Trypsin-like Immunoreactivity*) angesehen werden. Hierbei werden sowohl Trypsin als auch dessen Vorstufe, das Trypsinogen, im Serum nachgewiesen. Bei Vorliegen einer exokrinen Pankreasinsuffizienz sind die Werte deutlich erniedrigt. Ein deutlicher Anstieg der TLI Werte ist hingegen hinweisend auf eine Pankreatitis (Steiner, Williams 2000; Steiner 2012).

Tabelle 1: Richtwerte fTLI im Blutserum

fTLI Wert in ng/ml	
Normalwerte	12-82
Pankreatitis	> 100
Pankreas-Insuffizienz	< 12

Die Detektion von fTLI aus Serumproben mittels Oberflächen Plasmon Resonanz kann eine schnelle und unkomplizierte Methode zur Diagnostik sein. Zur Etablierung eines entsprechenden Assays wurde ein Linkerprotein bestehend aus ConA (siehe Kapitel 1.2.1) und Protein A entwickelt, um spezifische Antikörper gegen fTLI auf einer mit Zucker funktionalisierten Biosensorchipoberfläche zu immobilisieren. Zudem lässt dieses Linkerprotein aber auch die Möglichkeit Anwendung in anderen Bereichen zu finden, da sich durch das Protein A verschiedenste Antikörper der IgG Familie auf der Oberfläche immobilisieren lassen.

1.3.2.1.1 Protein A

Protein A (ProtA) stammt ursprünglich aus der Zellwand des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* und ist ein Protein von ca. 42 kDa Molekulargewicht. Es besitzt die Fähigkeit, an den Fc-Teil von humanen Immunglobulinen der Subklassen G1 und G2 und an G2a, G2b und G3 der Maus mit hoher Affinität zu binden (Shuttleworth et al. 1987). Protein A dient dem Bakterium zum Schutz vor dem Immunsystem im Körper, da durch die Bindung wirtseigener Antikörper die Erkennung durch das Immunsystem des Wirts gestört ist.

ProtA findet in der Biochemie eine breite Anwendung. Rekombinantes ProtA wird meist in *E. coli* produziert und kann mit anderen Substanzen wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffen, kolloidalem Gold, Enzymen und Biotin markiert werden. Gekoppelt an Beads (Latex, Gold, Sepharose) kann ProtA zur Reinigung von Antikörpern aus komplexen Matrices, wie z.B. Serum genutzt werden. Diese Anwendungsmöglichkeit macht es zu einem geeigneten Teil des Linkerproteins ConA-ProtA, zur gerichteten Immobilisierung von Antikörpern auf Biosensorchipoberflächen und 3D-Materialien.

Die Gleichgewichtskonstante der Bindung von Antikörpern an ProtA beträgt $2,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Saha et al. 2003). Es ist aus fünf Untereinheiten mit jeweils einer eigenen IgG-Bindestelle (Sjödahl 1977) aufgebaut. Die Untereinheiten A, B, C, und D sind sich untereinander sehr ähnlich. Die Untereinheit E ist in ihrer Sequenz abweichend, aber dennoch ähnlich. Region E scheint daher evolutionär aus der gleichen Gensequenz entstanden zu sein, hat aber im Gegensatz zu den anderen 4 Regionen weniger die Rolle der Fc-Bindung, denn einer anderen biologischen Funktion (Moks et al. 1986). In Abbildung 66 Kapitel 5.9.1 sind die Sequenzen der 5 verschiedenen Regionen des Protein A dargestellt.

Für die Klonierung des Linkerproteins ConA-ProtA wurde die resultierende Konsensus Sequenz verwendet. Dies soll die Problematik einer inkorrekten Faltung des resultierenden Proteins minimieren, da durch die Verwendung von nur einer Domäne sich die Größe des Linkerproteins fast halbiert. Zudem besitzen die 5 Domänen untereinander eine festgelegte Faltungsformation. Falls diese durch die Kombination mit ConA gestört würde, könnte dies zu einem absoluten Funktionsverlust des Proteins führen. Die genauen Angaben zur Klonierungsstrategie und Sequenzen sind im Ergebnisteil beschrieben.

1.3.2.1.2 Antikörper: IgG-Globuline

Antikörper sind glykosylierte Immunglobuline, die die humorale Immunabwehr vermitteln. Antikörper können eine extrem hohe Anzahl an unterschiedlichen Spezifitäten entwickeln. Es gibt 5 unterschiedliche Klassen von Immunglobulinen: A, M, D, E und G wobei die G-Klasse in der Biotechnologie und Analytik die meiste Verwendung findet. Sie werden zumeist durch Immunisierung von Tieren (Maus, Ratte, Kaninchen etc.) oder in Gewebekulturen hergestellt. Während der Immunisierung reagiert der Organismus mit der Produktion von Antikörpern, welche sich im Blut anreichern. Die an der Immunantwort beteiligten B-Lymphozyten produzieren jeweils eine leicht verschiedene Antikörpervariante gegen verschiedene Epitope eines bestimmten Antigens, wodurch eine große Variation an Antikörpern entsteht. Wegen dieser großen Anzahl spricht man von polyklonalen Antikörpern, da sie von unterschiedlichen Plasmazellen produziert werden, die genetisch verschieden sind (Lottspeich et al., 1998). Zur Gewinnung der Antikörper wird nun das Blutserum (Antiserum) extrahiert und gereinigt. Antikörper die mittels Hybridom Technik gewonnen werden, werden als monoklonale Antikörper bezeichnet, da sich ihr Ursprung in einem Klon gründet (Lottspeich, 1998).

Antikörper des Typs IgG bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 8 dargestellt. Die zwei leichten Ketten setzen sich zusammen aus einer variablen (V_L) und einer konstanten Domäne (C_L). Die schweren Ketten besitzen dagegen eine variable (V_H) und drei konstante Domänen (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}). Die beiden schweren Ketten sind über Disulfidbrücken am Übergang (der „hinge region“) von den C_{H1} - zu den C_{H2} -Domänen miteinander kovalent verbunden. Außerdem ist je eine leichte Kette über die C_L -Domäne mit der C_{H1} -Domäne von je einer schweren Kette durch eine Disulfidbrücke verknüpft. Die Antigenbindestellen werden gemeinsam

von den N-terminalen V_L - und V_H -Domänen gebildet. Dort finden sich die „complementarity determining regions“ (CDRs), welche die Antigen-Antikörper-Bindung ermöglichen. Die Domänen C_H2 und C_H3 bilden zusammen das Fc-Fragment (Fragment, crystallizable). Dieses trägt in der C_H2 -Domäne je eine Kohlenhydratkette, über die Proteine des Komplementsystems binden können. Die Domäne C_H3 enthält eine Bindestelle für Fc-Rezeptoren. Die V_H - und C_H1 -Domäne bilden zusammen die Fab-Region.

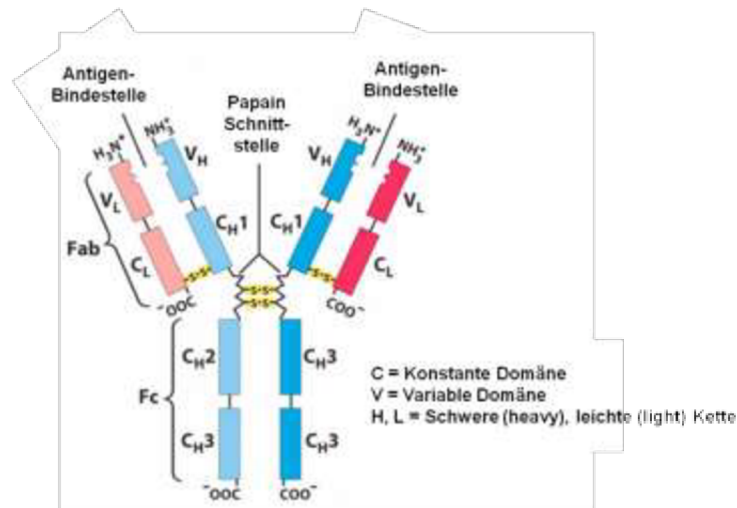


Abbildung 8 Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpermoleküls (Gammaglobulin)

Antikörper finden eine vielseitige Anwendung in der Analytik. Sie werden meist als Fänger- oder Detektorantikörper eingesetzt, wobei als Fängerantikörper meist polyklonale Antikörper genutzt werden. Fängerantikörper werden auf einer Oberfläche immobilisiert und dienen dem Extrahieren eines Antigens aus einem Probengemisch. Detektionsantikörper werden als zusätzlicher Nachweis und zu Amplifizierung des Detektionssignals verwendet. Sie sind meist monoklonal und hochspezifisch.

2 Zielsetzung

Ziel dieses Forschungsvorhabens war die Entwicklung mehrerer Fusions-/Linkerproteine, welche durch eine Lektinbindedomäne auf Zuckeroberflächen immobilisierbar sind. Als Lektinbindedomäne wurde Concanavalin A (ConA) ausgesucht, da es eine stabile und gerichtete, aber dennoch reversible Bindung auf Zuckeroberflächen ermöglichen soll. Die ConA-Domäne sollte durch Klonierung auf DNA-Ebene mit anderen funktionalen Domänen gekoppelt werden. Somit sollte eine Kombination beider Funktionen innerhalb eines Proteins erfolgen. Zudem würde es die ConA Bindedomäne erlauben das Fusions-/Linkerprotein, durch Waschen mittels eines speziellen Regenerationspuffers, von der Oberfläche zu lösen und dadurch die Regeneration der Oberfläche zu ermöglichen. Diese Regenerationsfähigkeit würde im Fall der 3D-Polymersinterkörper als Anreicherungsmodul in der *Point-of-Care* Diagnostik Verwendung finden, da sich ein gering konzentrierter Analyt in einem großen Probenvolumen zu einem höher konzentrierten Analyten in einem kleinen Probenvolumen aufkonzentrieren ließe. Zudem ist im Falle der Biosensorik diese Regenerierbarkeit ebenfalls von großem Interesse, da hierdurch ein Biosensorchip mehrmals hintereinander verwendet werden könnte, was einen erheblichen finanziellen Vorteil für den Verwender darstellen würde. Die Fusions-/Linkerproteine sollten zum einen als universeller Linker für biotinylierte Moleküle und Antikörper dienen, zum anderen, als Fusionsproteine, für die Sensitivitätssteigerung der spezifischen Detektion von Antikörpern aus Blutserum.

Als universelles Linkerprotein für die Immobilisierung von biotinylierten Antikörpern und anderen biotinylierten Molekülen, sollte die ConA-Domäne mit einer Streptavidin (SAv) Bindedomäne kombiniert werden. Durch diese Fusionierung würde eine gerichtete Immobilisierung der biotinylierten Moleküle auf planaren und dreidimensionalen Oberflächen ermöglicht. Dieses Protein sollte kloniert, in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt werden. Die Funktionstestung würde mittels Co-Immunopräzipitation, enzymgekoppeltem Immunabsorptionstest (ELISA), Oberflächen Plasmon Resonanz (SPR) und Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie (RIfS) erfolgen. Zur Anpassung der Bindungseigenschaften der ConA-Domäne an die Zuckeroberfläche waren Punktmutationen innerhalb der Bindetasche des ConA geplant. Die Mutanten sollten ebenfalls exprimiert und auf ihre Funktion getestet werden.

Des Weiteren waren spezifische Fusionsproteine geplant, die zur Borreliosedagnostik im Blutserum zum Einsatz kommen sollten. Diese Fusionsproteine sollten ebenfalls auf Zuckeroberflächen immobilisiert werden können und zum anderen die Oberflächenproteine eines Borrelien Bakteriums nachahmen, um eine Antikörperdiagnostik zu ermöglichen. Daher sollten diese Fusionsproteine aus ConA und möglichen Oberflächenantigenen des Borreliose-Bakteriums bestehen. OspC und VlsE wurden als potentielle Antigene ermittelt, die der Antikörperbindung aus Blutserum dienen könnten. Diese sollten einen Borreliose-Assay auf planaren Zuckeroberflächen ermöglichen sowie die Anwendung in dreidimensionalen Polymersinterkörpern, die in der *Point-of-Care* Diagnostik eingesetzt werden könnten. Zudem sollte neben der Funktionstestung durch Biosensoren (SPR, RIfS), eine ELISA Messreihe durchgeführt werden, um Aussagen über die Stabilität und Lagerungsfähigkeit der Proteine machen zu können. Diese Ergebnisse hätten Einfluss auf den industriellen Einsatz der Fusionsproteine.

Zuletzt sollte ein universelles Linkerprotein zur gerichteten Immobilisierung von unmarkierten Fängerantikörpern auf Zuckeroberflächen entwickelt werden. Hierzu würde die Komponente ConA mit einer Bindedomäne des Protein A fusioniert und in *E. coli* exprimiert. Zur Anwendung sollte das Linkerprotein über die Detektion zur Pankreatitis und Pankreasinsuffizienz bei Katzen (fTLI) gebracht werden. Die grundlegende Funktionstestung sollte mittels eines Modell-Assays erfolgen. Hierzu würden die Methoden SPR und RIfS Anwendung finden. Die Testung des Linkerproteins mit Realproben sollte durch Erstellung von Kalibriergeraden mit Proben bekannter Konzentration erfolgen. Nach erfolgreicher Anwendung auf zweidimensionalen Oberflächen, würde der Modell Assay anschließend auf die 3D-Polymersinterstruktur übertragen werden, um den Einsatz in der *Point-of-Care* Diagnostik darzustellen. Abschließend sollte der Assay mit Realproben im ABICAP[®] System des Herstellers Senova durchgeführt und validiert werden.

3 Material

3.1 Lösungsmittel und Chemikalien

In den folgenden Tabellen sind alle Lösungsmittel und Chemikalien aufgelistet, die während der Arbeiten verwendet wurden.

Tabelle 2: Lösungsmittel

Lösungsmittel	Hersteller/Lieferant	Qualität
Toluol	Merck KGaA, Darmstadt	for gaschromatography SupraSolv®
Toluol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	ROTISOLV® ≥99,8%, GC Ultra Grade
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	ROTISOLV® ≥99,98%, Ultra LC-MS
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt	Für die Gaschromatographie, SupraSolv®
ddH ₂ O	hausintern	

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Lieferant	Qualität
Agarose Standard	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	Roti® agarose für die DNA/RNA-Elektrophorese
3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	≥98%
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	≥98 %
1,4-Butandiol diglycidylether (BDDG)	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	≥95%
Calciumchloride Dihydrat (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	≥99,5%
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva Feinbiochemie GmbH & Co. KG, Heidelberg	
Dextran	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	von <i>Leuconostoc</i> spp. (6 kDa)

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim,	anhydrous $\geq 99,9\%$
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt	zur Analyse
Ethanolamin Hydrochlorid	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	purum $\geq 98\%$ (AT)
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	0,025 % i. d. Tropfflasche, wässrige Lösung (250 $\mu\text{g/ml}$)
3-Glycidoxypropyldimethylethoxysilan	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	97%
Guanidinhydrochlorid	Applichem GmbH, Darmstadt	99%, BioChemica
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	$\geq 99,5\%$, p.a.
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	$\geq 99,5\%$, Buffer Grade
Mannan	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Mangan (II) Chlorid Tetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	$\geq 99\%$
Methyl- α -D-mannopyranosid	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	
Natriumacetat	Riedel-de Haen	anhydrous, $\geq 99,9\%$
Natriumborhydrid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	$\geq 97\%$, Granulat
Natriumborhydrid	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	purum p.a. $\geq 96\%$ (gas volumetric)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	$\geq 99,5\%$, p.a. ACS, ISO
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	purum p.a. crystallized, $\geq 99\%$ (T)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	$\geq 99,5\%$ für die Elektrophorese
Natriumhydroxid	hausinterne Quelle	

Natriumtetraborat Decahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich Co. LLC), Steinheim	
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	BioReagent, suitable for electrophoresis, ~99%
PAGE Ruler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Roth	10-170 kDA
Rotiphorese® Gel A	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	A - 30 % Acrylamidlösung B - 2 % Bisacrylamidlösung
Schwefelsäure	Fisher Chemicals AG, Loughborough, UK	≥95%, analytical reagent grade
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Merck KGaA, Darmstadt	GR for analysis
Octadecyltrimethoxysilan	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim,	technisch, ≥90% (GC)
Triton X 100 (Alkylphenylpolyethylenglykol)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe	reinst
Tween® 20	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim	≥30%, TraceSELECT® Ultra, for ultratrace analysis
Zitronensäure (2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid)	(KMF Laborchemie)	
<i>Blocking Solution</i> ®	CANDOR Bioscience GmbH, Wangen	
<i>Liquid Plate Sealer</i> ®	CANDOR Bioscience GmbH, Wangen	

3.2 Instrumente

Alle Instrumente die während der Arbeiten verwendet wurden sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 4: Instrumente

Instrument		Hersteller	Details
Pufferfiltration	Puffer-Filtrierungs-Gerät	VWR International GmbH, Darmstadt	1000 ml
BIAffinity		Analytik Jena AG, Jena	Nullserie Generation 1
BIAffinity		Analytik Jena AG, Jena	Nullserie Generation 2
CP225D-OCE	Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen	
Elektronikrührer POLY15	Magnetrührer	Variomag, Daytona Beach, USA	
Hera Safe	Gentechnische Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific, Schwerte	
Hereaus Pico17	Zentrifuge	Thermo Scientific, Schwerte	
Hitachi S-510	Rasterelektronenmikroskop		
HTM130	Heizblock	HLC	
KNF Laboport	Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg i.B.	
Lab 850	pH-Meter	Schott AG, SI Analytics GmbH, Mainz	
Mini-PROTEAN® Tetra	Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	
Multiskan EX	ELISA-Platten Reader	Thermo Scientific, Schwerte	
NanoWizard™	Atomic Force Mikroskop (AFM)	JPK Instruments, Berlin	
NSC 16 AIBS	AFM cantilevers	Micromasch, Estonia	Ultra sharp tips (Spitzenradius < 10 nm), Länge 125 µm, Federkonstante 36 N/m
Ofen		Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach	

Pipetten Research		Eppendorf AG, Hamburg	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl
Plasmonic Biosensor		Plasmonic,, Wallenfels, Deutschland	
SmartSpec 3000	Photometer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Zellzahlbestimmung
Sonorex	Ultraschallbad	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin	35 kHz
Titramax 101	Plattenschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach	

3.3 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Präzisionswischtücher	KIMTECH Science	Kimberly-Clark Professional
Filtervorsatz	CHROMAFIL® PET-45/25	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Spritzen + Kanülen	NORM-JECT® 5 ml (6 ml)	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Spritzen + Kanülen	NORM-JECT® 1 ml	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Mikrotiterplatten	Costar 3590, 96Well EIA/RIA Plate, Flat Bottom without Lid, High Binding Polystyrene	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim

3.4 Enzyme, Kits, Seren, Antikörper und Proteine

In der folgenden Tabelle sind alle Enzyme und Plasmide aufgelistet, die während der Arbeiten mit den DNA-Konstrukten verwendet wurden. Die dazugehörigen Puffer wurden vom Hersteller mitgeliefert und nach Anweisung verwendet.

Tabelle 6: DNA-Enzyme und Plasmide

Enzyme/Plasmide	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
<i>Nco</i> I	Restriktionsenzym Schnittstelle CCATGG	Fermentas, St Leon Roth, Germany
<i>Xho</i> I	Restriktionsenzym Schnittstelle CTCGAG	Fermentas, St Leon Roth, Germany
<i>Pfu</i> DNA Polymerase, (re-kombinant)	DNA Polymerase	Fermentas, St Leon Roth, Germany
<i>Taq</i> DNA Polymerase, (rekombinant)	DNA Polymerase	Fermentas, St Leon Roth, Germany
T4 DNA Ligase	DNA-Ligase	Fermentas, St Leon Roth, Germany
pET-15b Vektor	Plasmid/Vektor	Novagen, EMD Millipore, Darmstadt, Deutschland

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über verwendete Kits, die während der Arbeiten mit den DNA Konstrukten verwendet wurden.

Tabelle 7: Kits

Kits	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant	Anmerkungen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Plasmidpräparations-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	
QIAquick Gel Extraction Kit	Gel Extraktion	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	Gel Extraktion von 10 µg DNA (70 bp bis 10 kb)
QIAEX II Gel Extraction Kit	Gel Extraktion	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	Aufreinigung von DNA Fragmenten (40 bp to 50 kb)
Quick Change	Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, Kanada	

Die nachfolgende Tabelle enthält alle Seren, die während der Arbeit für die Testung der Borreliose Assays verwendet wurden.

Tabelle 8: Seren für Borreliose Assay

Serum	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant	Lieferdatum
Humanes Serum	Pool-05 Borrelia	Seramun Diagnostika GmbH, Berlin, Deutschland	30.08.2011
Humanes Serum	Hd3	Seramun Diagnostika GmbH, Berlin, Deutschland	25.03.2013
Humanes Serum	CL-041	Seramun Diagnostika GmbH, Berlin, Deutschland	13.02.2013
Humanes Serum	CL-141	Seramun Diagnostika GmbH, Berlin, Deutschland	13.02.2013
Humanes Serum	SB 1972	Seramun Diagnostika GmbH, Berlin, Deutschland	25.03.2013
Humanes Serum	SB 1974	Seramun Diagnostika GmbH, Berlin, Deutschland	25.03.2013
Humanes Serum	SB 1976	Seramun Diagnostika GmbH, Berlin, Deutschland	25.03.2013
Humanes Serum	SB 1982	Seramun Diagnostika GmbH, Berlin, Deutschland	25.03.2013
Humanes Serum	SB 1983	Seramun Diagnostika GmbH, Berlin, Deutschland	25.03.2013

Die nachfolgende Tabelle enthält alle Seren, die während der Arbeit für die Testung des fTLI Assays verwendet wurden.

Tabelle 9: Seren für fTLI Assay

Serum	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant	Konzentration von fTLI [ng/ml]
Felines Serum	S41225	Laboklin Labor für klinische Diagnostik GmbH Co KG, Bad Kissingen, Deutschland	7,7
Felines Serum	S41648	Laboklin Labor für klinische Diagnostik GmbH Co KG, Bad Kissingen, Deutschland	8,85
Felines Serum	S37462	Laboklin Labor für klinische Diagnostik GmbH Co KG, Bad Kissingen, Deutschland	10
Felines Serum	S39325	Laboklin Labor für klinische Diagnostik GmbH Co KG, Bad Kissingen, Deutschland	12,8

Felines Serum	S42611	Laboklin Labor für klinische Diagnostik GmbH Co KG, Bad Kissingen, Deutschland	13,5
Felines Serum	S37666	Laboklin Labor für klinische Diagnostik GmbH Co KG, Bad Kissingen, Deutschland	24,6
Felines Serum	S38177	Laboklin Labor für klinische Diagnostik GmbH Co KG, Bad Kissingen, Deutschland	53,2
Felines Serum	S39330	Laboklin Labor für klinische Diagnostik GmbH Co KG, Bad Kissingen, Deutschland	120

Alle verwendeten Antikörper unmarkiert sowie markiert sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 10: Antikörper

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant	Anmerkungen
Anti Streptavidin	Monoclonal Antibody to Streptavidin-Purified Lot. A1211901	Acris Antibodies, GmbH.; Herford, Deutschland	Wirt: Maus, monoklonal, Reaktivität: IgG2b
Anti IgG-HRP Mouse	Polyclonal Antibody to Mouse IgG (H&L)-HRP Lot. 23976	Acris Antibodies, GmbH.; Herford, Deutschland	Wirt: Hase, polyclonal, Reaktivität: IgG whole molecule, HRP Label
Anti IgG-HRP Rabbit	Polyclonal Antibody to Rabbit IgG (H&L)-HRP Lot. 22489	Acris Antibodies, GmbH.; Herford, Deutschland	Wirt: Ziege, polyklonal, Reaktivität: IgG whole molecule, HRP Label
Anti- <i>Canavalia ensiformis</i> Lectin	C7401	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Wirt: Rabbit, Fractionated Antiserum
Anti-ConA-HRP	Polyclonal Antibody to Concanavalin A-HRP Lot. 20-783	Acris Antibodies, GmbH.; Herford, Deutschland	Wirt: Ziege, polyklonal, Reaktivität: IgG, HRP-Label
Anti-BSA	Polyclonal Antibody to Bovine Albumin-Biotin Lot. 22777	Acris Antibodies, GmbH.; Herford, Deutschland	Wirt: Hase, polyklonal, Reaktivität: Albumin whole molecule, biotinyliert
Anti IgG Human HRP		Seramun	HRP Label

Anti-Ig fraction Antikörper	ABIN400073	Antikörper online GmbH, Aachen, Deutschland	Wirt: Hase, Reaktivität: Kaninchen, polyklonal, Reaktivität: Ig Fraktion
Anti-Ig fraction Antikörper (Bio- tin)	ABIN375976	Antikörper online GmbH, Aachen, Deutschland	Wirt: Ziege, Reaktivität: Kaninchen, polyklonal, Reaktivität: Ig Fraktion, Biotin Label
Anti- Trypsinogen Try2		fzmb GmbH, Bad Langensalza, Deutsch- land	Wirt: Maus, Reaktivität: Human; Detektorantikörper
Anti- Trypsinogen Try3		fzmb GmbH, Bad Langensalza, Deutsch- land	Wirt: Maus, Reaktivität: Human; Fängerantikörper

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Proteine, entweder bezogen über Hersteller von außerhalb sowie die selbst hergestellten Proteine.

Tabelle 11: Proteine

Proteine	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant	Anmerkungen
Concanavalin A	<i>Canavalia ensi- formis</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim, Deutschland	Type V
Streptavidin	<i>Streptomyces avidinii</i>	Prozyme, USA	
Protein A	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC, Steinheim, Deutschland	
BSA (bovines Se- rum Albumin),	Aus Rinderserum	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	albumin fraction V, for biochemistry
ConA-SAv		AK Keusgen	in PBS, pH 7,3
ConA-OspC		AK Keusgen	in PBS, pH 7,3
ConA-C6		AK Keusgen	in PBS, pH 7,3
ConA-ProtA		AK Keusgen	in PBS, pH 7,3
fTLI	Rekombinant	Fzmb GmbH, Bad Langen- salza, Deutschland	In 50% Glycerol und PBS, pH 7,3

3.5 Antibiotika

Der Vektor pET-15b enthält eine Ampicillinresistenz. Daher wurde während der Klonierung und Proteinexpression Ampicillin (A9518, Sigma-Aldrich) in einer Arbeitskonzentration von 100 µg/ml zur Selektion verwendet.

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 PCR, Klonierung

Die genetische Fusionierung der jeweils zwei Bindedomänen wurde mit etablierten Klonierungstechniken durchgeführt (Maniatis, Fritsch, Sambrook 1982). Die cDNA von pre-pro-ConA wurde C-terminal an die cDNA der jeweiligen zweiten Bindedomäne designed. Um die Stabilität, bzw. Flexibilität der beiden Domänen zu gewährleisten, wurden jeweils kurze Linkersequenzen eingefügt. Die artifiziellen Gene wurden von den Firmen GENEART AG (Regensburg, Deutschland) und Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Nach erfolgter Codonoptimierung der Gensequenzen wurden die Gene synthetisiert und in einen Zwischenvektor eingebracht. Aus diesem Zwischenvektor wurde die Gensequenz mittels Restriktion herausgeschnitten und in den Vektor pET-15b (Novagen, Darmstadt, Deutschland) ligiert.

Die Subklonierung in pET-15b erfolgte in allen Fällen nach folgendem Schema:

Nach der Restriktion des Zwischenvektors mit den Enzymen *NcoI* und *XhoI* wurde der pET-15b Vektor ebenfalls mit diesen Enzymen linearisiert. Anschließend wurden alle Fragmente über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und für einen Ligationsansatz verwendet. Durch die überhängenden Enden (sticky ends) der Schnittstellen von *NcoI* und *XhoI* konnte die Gensequenz des Linkerproteins zielgerichtet in die *multiple cloning site* des Vektors pET-15b eingebracht werden.

4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese werden die DNA-Moleküle der Größe nach aufgetrennt. Hierbei läuft die negativ geladene DNA, angetrieben durch ein kontinuierliches Spannungsfeld, durch eine Gelmatrix zur Anode. Die Laufstrecke der doppelsträngigen DNA ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Moleküllänge (Helling et al. 1974). Die Agarosekonzentration des Gels hat einen Einfluss auf die Trenneigenschaften eines Gels. Höherprozentige Gele eignen sich zur Trennung von klei-

neren Molekülen, niedrigprozentige hingegen eignen sich zur Trennung von großen Molekülen.

<u>Fragmentlänge</u>	<u>Agarosekonzentration</u>
50-500bp	1,5-2%
500-1000bp	1%
über 1000bp	0,8%

Die DNA-Agarosegele enthielten zusätzlich Ethidiumbromid, welches mit doppelsträngiger DNA interkaliert und bei Anregung im UV-Licht fluoresziert.

Tabelle 12: Agarosegel-Elektrophorese

Puffer und Reagenzien	
Agarose Standard	1 %ig (w/v) in 1x TAE-Puffer
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 0,5 M EDTA pH 8,0 100 ml; H ₂ O ad 1 L
5x DNA-Probenpuffer	1% (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 100 mM EDTA; 50 % (w/v) Glycerin
Ethidiumbromid-Lösung	0,025 % i. d. Tropfflasche , wässrige Lösung (250 µg/ml) Mit zwei Tropfen Ethidiumbromid-Lösung färbt man ein 50 ml Agarosegel

Zur Herstellung eines Gels wurde Agarose 1%ig in 1x TAE Puffer aufgekocht. Nachdem die aufgekochte Agarose auf ca. 60°C abgekühlt war, konnten zwei Tropfen Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt werden, und die Agarose-Lösung anschließend in die Gelapparatur gegossen werden. Die Gelapparatur war mit Kämme ausgestattet, die die Ladetaschen des Gels aussparen. Ladetaschen für analytische Gele fassen 20 µl, präparative Gele bis zu 50 µl. Nach Aushärten des Gels wurde es im Kühlschrank in einer Verpackung, die das Austrocknen verhindert, bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die DNA-Proben wurden vor dem Laden mit 5-fach DNA Probenpuffer versetzt. Das Gel wurde vor dem Beladen in eine horizontale Gel-Laufkammer gelegt, vollständig mit 1x TAE-Puffer überschichtet und anschließend mit den Proben sowie dem Größenmarker beladen. Bei der Elektrophorese wurde an die Gelkammer eine konstante Spannung von

80 V angelegt. Das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau wanderte während der Elektrophorese auf Höhe der DNA-Fragmente von ca. 100 Bp. Anhand dieser Lauffront konnte der Gellauf beobachtet werden und diente als Orientierung zur Beendigung des Gellaufs.

4.1.3 Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA Fragmenten

Auf einem UV-Transilluminator (Dark Hood DIT-50 mit Gerix 1000, Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland) erfolgte die Detektion der DNA-Fragmente im Agarosegel. Das enthaltene Ethidiumbromid im Agarosegel interkalierte mit der doppelsträngigen DNA und wurde durch das UV-Licht angeregt, wodurch es fluoreszierte. Die dadurch sichtbaren DNA-Banden konnten mit einer Kamera photographisch dokumentiert werden. Als Marker wurden der Gene Ruler High Range DNA Ladder und der Gene Ruler Low Range DNA Ladder von Fermentas (Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die Spezifikationen sind der unten stehenden Abbildung zu entnehmen. Es wurden jeweils 5 µl der beiden Marker zusammen in eine Lane aufgetragen, um das Spektrum von 10.000 Bp bis 80 Bp der Markermoleküle zu erhalten.

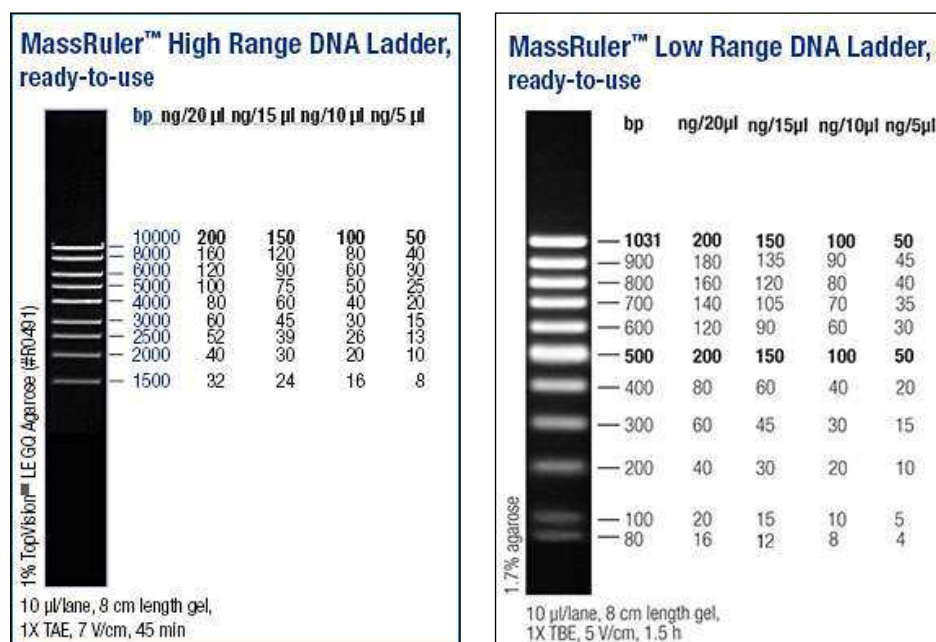


Abbildung 9: Größenmarker für DNA-Gelelektrophorese

Der Größenmarker wurde auf einer separaten Spur neben den Proben aufgetragen. Dieser wurde gleichzeitig, während der Elektrophorese, mit den Proben aufgetrennt. Die dadurch entstehenden DNA-Fragmente definierter Größe dienten als Größenstandard für die DNA-Fragmente der aufgetragenen Proben. Die Fragmentgrößen des Markers waren vom Hersteller definiert. Durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar, wobei die jeweiligen Fragmente unterschiedliche Fluoreszenzleuchtstärken aufwiesen. Den unterschiedlichen Intensitäten der Fluoreszenz kann eine definierte DNA-Konzentration nach Herstellerangaben zugeordnet werden. Durch Vergleich mit den Intensitäten der Fluoreszenz der Fragmente der DNA-Proben konnte die DNA-Konzentration der Proben abgeschätzt werden.

4.1.3.1 Isolierung und Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Im Anschluss an eine Agarose-Gelelektrophorese konnten DNA Fragmente aus dem Gel eluiert werden. Hierzu wurde das „Gel Extraction Kit QIAEX II“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Zur Extraktion der DNA wurden die Fragmente im Agarosegel auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mittels eines Skalpells herausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die entsprechenden Puffer- und Silikatmatrix-Mengen wurde hinzugegeben. In den folgenden Schritten der Elution, gemäß dem Hersteller, wurde die DNA unter Hochsalzbedingungen an die Silikatmatrix gebunden und nach anschließenden Waschschritten unter Niedrigsalzbedingungen wieder von der Silikatmatrix gelöst. Das entstandene Pellet wurde in EB-Puffer gelöst.

Tabelle 13: Puffer für Elution von DNA-Fragmenten

Puffer und Reagenzien	
EB-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.5)

4.1.4 Mutagenese

Es wurde das „QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Agilent Technologies (Canada) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers.

Tabelle 14: Medien und Reagenzien zur Mutagenese

Puffer und Reagenzien	
<i>Pfu</i> Turbo®DNA polymerase (2.5 U/ µl)	80 U
10× reaction buffer	500 µl
<i>Dpn</i> I restriction enzyme (10 U/µl)	300 U
Oligonucleotide control primer #1 [34-mer(100 ng/µl)]	750 ng
Oligonucleotide control primer #2 [34-mer(100 ng/µl)]	750 ng
pWhitescript™ 4.5-kb control plasmid (5ng/ µl)	50 ng
dNTP mix	30 µl
XL1-Blue supercompetent cells	8 x 200 µl
pUC18 control plasmid (0.1 ng/µl in TE buffer)	10µl

Die Primer für die Mutagenese wurden von Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) hergestellt und geliefert.

Tabelle 15: Primer für Mutagenese

Primer für Mutagenese				
Oligoname	Sequenz 5`-> 3`	GC-Gehalt	TM [°C]	MW [g/mol]
Primer1 Position 90	GCCATCCGGCAAATGGTATTGC (22)	54,5%	62,1	6735
Primer2 Position 90	GCAATACCATTGCGGATGGC (22)	54,5%	62,1	6735
Primer1 Position 110	CCAAGGAGCATTCCAGTGG (19)	57,9%	53	5814
Primer2 Position 110	CCACTGGAATGCTCCTTGG (19)	57,9%	53	5814

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Organismen

4.2.1.1 Bakterienstämme

Verwendet wurde der *E. coli*-Bakterienstamm XL1-blue zur Klonierung und Plasmidpräparation. Die XL1-blue Zellen wurden von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) bezogen. Zur Proteinexpression wurde der *E. coli* Bakterienstamm BL21 (DE3) verwendet. Die BL21 (DE3) Zellen wurden ebenfalls von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) bezogen.

4.2.2 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die Calciumchlorid-Methode (Mandel, Higa 1970) angewandt. Hierfür wurden, mit 2 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1-blue Zellen, 250 ml LB-Medium angeimpft und diese bei 18°C und 220 rpm angezogen, bis die Zellkultur eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 bei 600nm erreicht hat. Nun wurde die Kultur für 10 min auf Eis inkubiert und die Zellen durch Zentrifugation bei 2.500 x g und 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 40 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Waschen des Pellets mit TB-Puffer wurden die Zellen in 9,3 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und mit 0,7 ml DMSO versetzt. Hiernach wurden die Zellen erneut für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße zu je 300 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Tabelle 16: Medien und Reagenzien zur Herstellung kompetenter Zellen

Medien und Reagenzien	
LB-Flüssigmedium	10 g/l Bacto™-Trypton; 5 g/l Bacto™-Yeast Extract; 5 g/l NaCl
TB-Puffer	10 mM Pipes; 15 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O; 250 mM KCL, 55 mM MnCl ₂ x 4 H ₂ O; pH 6,7
DMSO	Dimethyl-sulfoxid (Acros Organics BVBA, Geel, Belgien)

4.2.3 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* Zellen wurde nach dem Vorbild von Hanahan (1983) durchgeführt. Hierzu wurden Ansätze von 100 µl kompetenten XL1-blue Zellen auf Eis aufgetaut und mit 5 µg Plasmid-DNA versetzt und vorsichtig durchmischt. Der Transformationsansatz wurde nun 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 1 min mit 42°C Hitzeschock behandelt. Nach dem Hitzeschock folgte ein Kälteschock von 2 min auf Eis. Der 100 µl Transformationsansatz wurde nun mit 900 µl sterilem LB-Flüssigmedium (ohne Antibiotikum, angewärmt auf ca. 37°C) aufgefüllt und für 1 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Dieser Inkubationsschritt dient der Regeneration der Zellen und dem Aufbau der Antibiotikaresistenz des aufgenommenen Plasmids. Danach wurden die Transformationsansätze auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und bei 37°C über Nacht im Wärmeschrank inkubiert.

Tabelle 17: Medien und Reagenzien zur Transformation von *E. coli*

Medien und Reagenzien		
LB-Flüssigmedium		10 g/l Bacto™-Trypton; 5 g/l Bacto™-Yeast Extract; 5 g/l NaCl
LB-Agar-Platten	LB-Agar	LB-Flüssigmedium + 1.5 (w/v) Bacto-Agar + Antibiotikumstammlösung
	Petrischalen	Ø 8.5 cm
Ampicillin (Amp)		100 mg/ml Stammlösung in Aqua bidest. (sterilfiltriert) 100 µg/ml Arbeitskonzentration

Bestimmung der Transformationseffizienz:

Um die Transformationseffizienz der Zellen zu bestimmen, wurden 100 µl kompetente Zellen mit 1 ng Plasmid-DNA transformiert und zu je 10 µl und 100 µl auf selektive LB-Platten ausplattiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Kolonien der Platten gezählt und mit folgender Formel die Kompetenz der Zellen errechnet:

$$\frac{\text{Kompetente Zellen } [\mu\text{l}] + \text{LB } [\mu\text{l}]}{\text{Ausplattiertes Volumen } [\mu\text{l}]} \times \text{Kolonienzahl} = \frac{\text{Kolonien}}{1 \text{ ng DNA}}$$

4.2.4 Herstellung von Glycerol Gefrierkulturen zur Stammhaltung

Zur Stammhaltung von transformierten Bakterienstämmen wurden Glycerol-Gefrierkulturen angelegt, mittels denen man wieder Einzelkolonien gewinnen konnte.

Tabelle 18: Medien und Reagenzien zur Herstellung von Glycerol-Gefrierkulturen

Medien und Reagenzien		
LB-Flüssigmedium		10 g/l Bacto™-Trypton; 5 g/l Bacto™-Yeast Extract; 5 g/l NaCl
Kryoröhrchen		2 ml; verschraubbar
LB-Agar-Platten	LB-Agar	LB-Flüssigmedium + 1.5 (w/v) Agar + Antibiotikumstammlösung
	Petrischalen	Ø 8.5 cm
Glycerol		50%-ige (v/v) Stammlösung
Ampicillin (Amp)		100 mg/ml Stammlösung in Aqua bidest. (sterilfiltriert) 100 µg/ml Arbeitskonzentration

Für die Herstellung von Glycerol-Gefrierkulturen wird ein 3 ml LB-Kulturröhrchen (mit Ampicillinzugabe) mit einer Kolonie von einer Selektionsplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Danach wurden 2 ml der Kultur in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 x g, 10 min und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 700 µl LB resuspendiert, mit 300 µl 50%igem Glycerol (v/v) versetzt und gut durchmischt. Die Kryoröhrchen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Proteinexpression

Eine 3 ml Übernachtskultur wurde mit einer Bakterienkolonie einer frischen Transformation angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurde eine 450 ml Hauptkultur mit 10 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm angezogen. Jeder Hauptkultur wurden 450 µl einer 1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranose-Lösung (IPTG-Lösung) zugegeben, um die Proteinexpression zu induzieren. Nach abgeschlossener Expressionszeit bei 37°C

und 220 rpm wurden die Kulturen geerntet. Die Zellsuspension wurde hierzu bei 6500 rpm und 4°C jeweils 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

Tabelle 19: Medien und Reagenzien zur Proteinexpression

Medien und Reagenzien		
LB-Flüssigmedium		10 g/l Bacto™-Trypton; 5 g/l Bacto™-Yeast Extract; 5 g/l NaCl
LB-Agar-Platten	LB-Agar	LB-Flüssigmedium + 1.5 (w/v) Agar + Antibiotikumstammlösung
	Petrischalen	Ø 8.5 cm
Ampicillin (Amp)		100 mg/ml Stammlösung in Aqua bidest. (sterilfiltriert) 100 µg/ml Arbeitskonzentration

4.3.2 Inclusion body-Aufreinigung

Die gelagerten Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in ca. 80 ml Inclusion body-Puffer 1 resuspendiert. Nun erfolgte eine Inkubation mit Lysozym. Hierzu wurden 1,5 mg Lysozym pro 1 g Zellmaterial kurz mit einem Vortexer gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die verbliebenen Zellen wurden mittels Ultraschall aufgebrochen. Um die Viskosität der erhaltenen Suspension herabzusetzen, wurde eine Inkubation mit Benzonase durchgeführt, die die enthaltene DNA abbaut. Hierzu wurden 10 µl Benzonase und 25 mg MgCl₂ zu der Lösung hinzugegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 80 ml Inclusion body-Puffer 2 (oder die äquivalente Menge zu Inclusion body-Puffer 1) zugefügt und abermals für 30 min auf Eis geschwenkt. Nach dieser Inkubation erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 20000 rpm und 4°C für 30 min. Diese, wie auch alle folgenden erwähnten Zentrifugationsschritte, wurden mit der Avanti™ J-25-Zentrifuge mit dem Rotor Ja-10 von Beckmann-Coulter (Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 30 ml einer Mischung aus Inclusion body-Puffer 2 und 3 (1:1) resuspendiert. Nach gründlicher Resuspendierung wurde die Suspension abermals bei 20000 rpm und 4°C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 ml einer Mischung aus Inclusion body-Puffer 2 und 3 (25:75) resuspendiert. Nach erneuter Resuspendierung wurde die Suspension abzentrifugiert (20000 rpm, 4°C, 30 min) und in 30 ml Inclusion body-Puffer 3 resuspendiert. Die

Lösung sollte zu diesem Zeitpunkt eine weiß-graue Färbung besitzen. Falls noch braune Bestandteile enthalten waren, mussten die vorherigen Schritte eventuell wiederholt werden. Nach einer abschließenden Zentrifugation bei 20000 rpm bei 4°C für 30 min wurde das Inclusion body-Pellet in einer angemessenen Menge Solubilisierungspuffer resuspendiert und über Nacht im Kühlraum gerührt. Am nächsten Tag wurde die Suspension nochmals zentrifugiert und der Überstand, in dem sich nun die gelösten Proteine befanden, bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Die Rückfaltung der Proteine erfolgte durch einen Verdünnungsschritt des Solubilisierungspuffers mittels PBS-Puffer, sodass eine Konzentration von 0,5 M Guanidiniumhydrochlorid erhalten wurde. Die Proteine wurden direkt nach Verdünnung auf die gewünschte Konzentration gebracht und sofort verwendet.

Tabelle 20: Medien und Reagenzien zur Inclusion body-Aufreinigung

Medien und Reagenzien	
Inclusion body-Puffer 1	0,1 M Tris, 5 mM EDTA, pH 7
Inclusion body-Puffer 2	60 mM EDTA, 1,5 M NaCl, 4 % Triton X100, pH 7
Inclusion body-Puffer 3	0,1 M Tris, 20 mM EDTA, pH 7
Solubilisierungspuffer	10 mM Tris, 10 mM NaCl, 50 mM DTT, 6 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 8

4.3.3 Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure

Zur Fällung eines Überstandes mit großem Volumen wurde so viel 1M Trichloressigsäure-Lösung in den Überstand gegeben, sodass sich eine Gesamtkonzentration von 7% ergab. Diese Lösung wurde gut durchmischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend fand eine Zentrifugation bei 14000 rpm statt, um das gefällte Protein zu sedimentieren. Das erhaltene Pellet wurde in 40 µl 5xSDS-Probenpuffer aufgenommen und ein Tropfen 1 M Tris-Lösung wurde zur Neutralisierung des pH Wertes hinzu getropft. Das Pellet wurde nun für 10 min bei 75°C aufgekocht und nochmals für 10 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und konnte bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

4.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Amidoschwarz-Methode

Eine häufig verwendete Methode zur Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung ist die Amidoschwarz-Methode (Popov et al. 1975). Hierbei bindet der Farbstoff Amidoschwarz 10B quantitativ an frei zugängliche Aminogruppen der Proteine, die durch das Methanol-Essigsäuregemisch (9:1) präzipitiert werden. In einem Waschschrift mit Waschpuffer wurde ungebundener Farbstoff entfernt. Anschließend wurde der gebundene Farbstoff mit 0,2 M NaOH-Lösung vom Proteinpellet gelöst. Nun konnte die Lösung photometrisch ausgewertet werden. Gemessen wurde die Absorption bei 615 nm, welche durch den Vergleich mit einer vorher erstellten Kalibriergeraden den Proteingehalt der Lösung angab. Die Kalibriergerade wurde unter Verwendung einer Standard-BSA-Lösung erstellt. Hierzu wurden folgende Proteinkonzentrationen hergestellt: 0, 5, 10, 15, 20 und 25 µg/µl BSA. Diese Proben wurden jeweils als dreifach Bestimmung angefertigt und die Absorption der Lösung gemessen. Anschließend wurden die erhaltenen Werte der dreifach Bestimmung gemittelt und in einer Regressionsgrade zusammengestellt.

Tabelle 21: Medien und Reagenzien zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Puffer und Reagenzien	
Amidoschwarz-Lösung	90% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; Amidoschwarz 10B (schrittweise bis zu einer OD ₆₁₅ = 10)
Waschlösung	90% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
NaOH	0,2 M in Aqua bidest.
Proteinstandard	10 mg/ml BSA

4.3.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) angewendet. Bei diesem System handelt es sich um ein diskontinuierliches Gel, bei dem die Probe zuerst in einem Sammelgel auf eine einheitliche Laufront gebracht wurde, um dann in das Trenngel überzugehen, in welchem die Aufspaltung der Proteine nach dem Molekulargewicht stattfand. Die Denaturierung der Proteine im Polyacrylamidgel wurde durch Natriumlaurylsulfat (SDS) hervorgerufen. Die negativ geladenen SDS-Moleküle lagerten sich an die Proteine an, wodurch die Auftrennung der Pro-

teine unabhängig von ihrer Nettoladung nur nach ihrem Molekulargewicht erfolgte, indem sie im elektrischen Feld zur Anode wanderten.

Tabelle 22: Medien und Reagenzien zur SDS-PAGE nach Lämmli

Puffer und Reagenzien	
Trenngel (10%)	10% (v/v) Acrylamid (Rotiphorese Gel A); 0,265% (v/v) Bisacrylamid (Rotiphorese Gel B); 375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS
Sammelgel (3,5%)	3,5% (v/v) Acrylamid (Rotiphorese Gel A); 0,13% (v/v) Bisacrylamid (Rotiphorese Gel B); 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,2% (w/v) SDS
Abdichtungsgel	1 ml Trenngel + 16 µl 10% (w/v) APS + 2,4 µl TEMED
Polymerisationsstarter	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS); TEMED
Elektrophoresepuffer	250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1% (w/v) SDS; in Aqua bidest.
5x SDS Probenpuffer	225 mM Tris-HCl, pH 6,8; 250 mM DTT; 5% (w/v) SDS; 50% (v/v) Glycerin 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Marker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde die Mini Protean® 3 Apparatur (Bio-Rad, München) verwendet. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist in dem folgenden Pipettierschema angegeben. Die Mengen beziehen sich auf zwei Mini-Gele (80 x 50 x 0,75 cm). Der Zusammenbau der Elektrophoresekammer erfolgte nach Herstellerangaben. Das maximale Ladevolumen einer Tasche betrug 20 µl. Die Auftrennung der Proben erfolgte unter konstanter Stromstärke bei 25 mA pro Mini-Gel und einer maximalen Spannung von 300 V. Die Laufzeit betrug ca. 40-50 Minuten, solange bis die mit Bromphenolblau gefärbte Lauffront das Gelende erreicht hatte. Danach wurden die Mini-Gele aus der Elektrophoresekammer entnommen und das Sammelgel mittels Skalpell entfernt. Die nachfolgende Tabelle (23) zeigt das Pipettierschema für zwei Mini-Gele.

Tabelle 23: Pipettierschema für SDS-PAGE

Stammlösung	Trenngel (10%)	Sammelgel (3,5%)
20% Acrylamid (Rotiphorese Gel A) + 0,53% Bisacrylamid (Rotiphorese Gel B)	5 ml	1,25 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	2,5 ml	---
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	---	1,25 ml
Aqua bidest.	2,5 ml	2,45 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
10% APS	40 µl	37,5 µl
TEMED	6 µl	2,5 µl

4.3.6 Western Transfer auf PVDF-Membran

Proteine, die zuvor über SDS-PAGE aufgetrennt wurden, konnten anschließend elektrophoretisch auf eine Membran übertagen werden (Renart et al. 1979; Towbin et al. 1979). Dadurch war eine spezifische immunologische Detektion der Proteine möglich.

Tabelle 24: Puffer und Reagenzien für Western Transfer auf PVDF-Membran

Puffer und Reagenzien	
Transferpuffer	48 mM Tris-HCl, pH 9,2; 39 mM Glycin; 0,0372 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol (Bjerrum und Schafer-Nielsen, 1986)
Roti®-Fluoro PVDF-Membran	Porengröße 0,2 µm, Bind. Hydrophob, L330xB26 cm, Artikel: 2803.1 Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Blotting-Papier MN 218 B	Macherey & Nagel, Düren

Vor dem Blot wurde das Mini-Gel mindestens 20 min in Transferpuffer äquilibriert. Währenddessen konnten das Blotting-Papier und die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran auf die Maße des Gels zugeschnitten und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert werden. Danach wurden das Mini-Gel, Blotting-Papier und PVDF-Membran wie folgt zusammengesetzt: Auf einer sauberen Glasplatte wurden drei Lagen Blotting-Papier

übereinander gelegt. Auf diesen Stapel wurde die PVDF-Membran gelegt und auf diese das Mini-Gel. Über das Mini-Gel wurden die restlichen 3 Lagen Blotting-Papier gelegt und anschließend, durch Ausrollen mit einem Reagenzglas, die Luftblasen im Stapel herausgedrückt. Der Stapel wurde dem Hersteller gemäß in die Wet-Blot-Apparatur eingespannt, sodass die Membran zur Anode, das Mini-Gel zur Kathode zeigte. Die Transferbedingungen wurden auf 100 V konst. und 350 mA bei 90 min Transferdauer festgelegt. Zur Überprüfung des Transfers wurde das Mini-Gel anschließend mit Coomassie angefärbt. In Kapitel 4.3.7 ist die anschließende Färbemethode für SDS-Gele beschrieben.

Die durch den Western-Transfer übertragenen Proteine auf der Membran ließen sich über spezifische Antikörper nachweisen. Das zu detektierende Protein stellte das Antigen für den primären Antikörper dar, welcher wiederum von einem sekundären Antikörper gebunden wurde. Der sekundäre Antikörper war mit einem Enzym, der Meerrettich-Peroxidase, konjugiert und konnte mittels ECL-Detektion ausgewertet und dokumentiert werden.

Tabelle 25: Puffer und Reagenzien zum Immunologischen Nachweis von Proteinen

Puffer und Reagenzien	
TBS Puffer	Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; in Aqua bidest.
TBS-T Puffer	Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20; in Aqua bidest.
Blocking-Puffer	7% Milchpulver in TBS
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Primärer Antikörper	1:1000 in TBS-T Puffer mit 0,05% Natrium-acid
Sekundärer Antikörper	1:10.000 in TBS-T Puffer

Für den immunologischen Nachweis wurde die Membran nach dem Western Transfer zuerst in Blocking-Puffer für 1 h bei RT und 50 rpm inkubiert (oder über Nacht bei 4°C). Durch dieses „Blocken“ der Membran sollten später unspezifische Antikörperbindungen weitestgehend verhindert werden. Alle weiteren Schritte wurden bei RT und 50 rpm in einem Volumen von 20 ml pro Membran durchgeführt. Nach dem Blocken wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS-T Puffer gewaschen und anschließend der primäre

Antikörper für 1 h inkubiert. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran erneut dreimal 10 min mit TBS-T Puffer gewaschen, um überschüssige Antikörper von der Membran zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der jeweiligen sekundären Antikörperlösung für 1 h. Zuletzt wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T Puffer für jeweils 10 min gewaschen.

4.3.7 ECL-Detektion des Western Transfers

Um den Western Transfer auf die PVDF-Membran sichtbar zu machen und auswerten zu können, wurde eine ECL-Detektion durchgeführt.

Tabelle 26: Puffer und Reagenzien für ECL-Detektion

Puffer und Reagenzien	
Luminol Stocklösung	L:3 Aminophthalhydrazid, Fluka 09253; 444 mg/10 ml DMSO; 1 ml Aliquots bei -20 °C
S1-Lösung	80 ml H ₂ O; 10 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5; 1 ml Luminol Stocklösung + 0,44 ml Stabilisatorlösung.
S2-Lösung	90 ml H ₂ O; 10 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5; 60 µl 30 % H ₂ O ₂
Gebrauchslösung	S1- und S2-Lösung 1:1 mischen, sofort gebrauchen
Stabilisatorlösung	p-Cumarinsäure, Sigma C 9008, 0,15 g/10 ml DMSO; 0,44 ml Aliquots bei -20 °C lagern
	S1- und S2-Lösungen in Aliquots bei -20 °C lagern
Entwicklerlösung	Kodak GBX “Developer and Replenisher“ Sigma P7042
Fixierer	Kodak GBX “Fixer and Replenisher” Sigma P7167
Film	Kodak BioMax light film

Nach erfolgtem Western Transfer wurde die PVDF-Membran in 0,5 M Tris/HCl Puffer pH 7,5 vorinkubiert, um restliches Tween zu entfernen, welches die ECL Reaktion hemmen würde. Nun wurde die Gebrauchslösung gemischt, indem S1- und S2-Lösung zu gleichen Teilen gemischt wurden. In dieser Gebrauchslösung wurde die Membran 30 sec geschwenkt, um danach sofort luftblasenfrei in eine Plastikfolie überführt zu werden. Ein

Film wurde passgenau zugeschnitten und mit der Membran belichtet. Die weitere Detektion in den einzelnen Entwicklungs- und Fixierbädern erfolgte nach Angaben des Herstellers Kodak.

4.3.8 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Um Proteinbanden in SDS-Gelen sichtbar zu machen, wurden sie mit einer Färbelösung, die Coomassie Brilliant Blue R-250 enthält, angefärbt. Hierzu wurde das Gel aus den Glasplatten entnommen, das Sammelgel abgeschnitten und das Trenngel mit der Färbelösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte über Nacht auf einem Tischschüttler bei 50 rpm. Anschließend wurde das Gel eine weitere Nacht in Entfärber bei 50 rpm geschwenkt, um den Gelhintergrund zu entfernen und die Proteinbanden sichtbar zu machen. Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Gele nach dem Entfärben in Aqua bidest. gewaschen, luftdicht verschweißt und eingescannt.

Tabelle 27: Puffer und Reagenzien zur Coomassiefärbung von SDS-PAGE Gelen

Puffer und Reagenzien	
Färbelösung	25% (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
Entfärber	10% (v/v) Essigsäure

4.4 Analytische Methoden

Zur Testung der Funktionalität der einzelnen Linker-/Fusionsproteine wurden verschiedene Verfahren angewendet. Es wurden Detektionsverfahren verwendet, in denen Markierungen, wie Enzyme, Gold oder Latex, notwendig sind sowie markierungsfreie Technologien, die eine ungestörte Interaktion der einzelnen Interaktionspartner ermöglichen.

4.4.1 Co-Immunopräzipitation

Eine Immunopräzipitation ist im einfachsten Fall ein Pulldown-Assay, in welchem mittels eines immobilisierten Antikörpers ein Antigen aus einer Lösung aufgereinigt wird (Kaboord, Perr, 2008; Dickson, 2008). In der Regel ist dabei der Antikörper an eine stati-

onäre Phase gekoppelt (z.B. quervernetzte Agarose- oder Dextrankugeln) und bindet ein spezifisches Antigen in einer Lösung. Nun kann durch die Präzipitation der stationären Phase die Aufreinigung erfolgen. Da Antigene, auch mitsamt möglicher Interaktionspartner, präzipitiert werden, eignet sich diese Methode auch zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen bis hin zu ganzen Proteinkomplexen. (Bonifacino, Dell'Angelica und Springer, 2001). In diesem Fall wurde die Matrix in Form der Sephadex Kügelchen als Grundlage für das Linkerprotein ConA-SAv genutzt. Das Linkerprotein band aufgrund der ConA-Domäne an die Dextranoberfläche und ein biotinylierter Antikörper wurde hinzugegeben. Dieser interagiert mit der Streptavidin Domäne des Linkerproteins. Im Anschluss wurde der Analyt spezifisch zum Antikörper inkubiert. Nach Präzipitation wurden die Dextran Kügelchen mit 20%iger (w/v) α -D-Methylmannopyranose-Lösung gespült, um den gesamten Proteinkomplex von der Oberfläche zu lösen. Die Co-Immunopräzipitation wurde mittels SDS-PAGE ausgewertet. Für die Co-Immunopräzipitations Experimente (Co-IP) wurden Sephadex[®] G-25 Beads verwendet. Sephadex[®] besteht aus quervernetzten Dextranmolekülen, welche eine hohe Bindeaffinität zu ConA aufweisen. Es wurden Proben nach jedem Schritt in der Co-IP genommen.

Tabelle 28: Puffer und Reagenzien für Co-Immunopräzipitation

Puffer und Reagenzien	
PBS; 30 mmol/l Phosphat, 120 mmol/l NaCl; pH 7,3	7,01 g NaCl + 4,27 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O + 0,94 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O; 900 ml vorbereiten, pH-Wert mit NaOH einstellen und auf 1 L Puffer auffüllen, 0,2 µm steril filtriert
Sephadex [®] G-25	Artikel. Nr.: G25150, CAS No. 9041-35-4, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Blocking Solution</i> [®]	CANDOR Bioscience GmbH, Wangen, Deutschland

Zuerst wurden die Sephadex[®] G-25 Beads nach Anweisung des Herstellers in PBS-Puffer vorgequollen. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. 200 µl der vorgequollenen Beads wurden für den Versuch verwendet. Sie wurden bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Um mögliche unspezifische Bindestellen zu blockieren, wurde ein Inkubationsschritt mit der *Blocking Solution*[®] für 2 h bei 100 rpm durchgeführt. Diese Blockierungslösung war BSA frei, basierte auf Casein Molekülen und zeigte keine ungewollte Interaktion mit BSA. Nach der Blockierung wurden die

Beads bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurden 250 µg des Linkerproteins ConA-Sav, in einem Volumen von 1 ml, zu den Beads gegeben und für 1 h bei 100 rpm inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Beads abzentrifugiert und 3 Waschschrte mit PBS-Puffer (jeweils 200 µl) durchgeführt. Die Überstände dieser Waschschrte wurden aufgefangen und mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, um sie nachher auf der SDS-PAGE (siehe Kapitel 4.3.4 und 4.3.7) zu analysieren. Nach diesen Waschschrten wurden 200 µl biotinylierter Antikörper gegen BSA in einer 1:1000 Verdünnung zu den Beads hinzugegeben und für 1 h bei 100 rpm inkubiert. Nach dieser Inkubation folgten wieder 3 Waschschrte mit PBS-Puffer (jeweils 200 µl) und die Überstände wurden für eine TCA Fällung gesammelt. Nun wurde der Analyt BSA mit den Beads inkubiert. Hierzu wurden 200 µl einer BSA Lösung (1 mg/ml) für 1 h bei 100 rpm hinzugegeben. Nach dieser Inkubation wurden die Beads wiederum 3-mal mit PBS-Puffer (jeweils 200 µl) gewaschen und der Überstand gefällt. Im Anschluss wurde die Co-IP mit 200 µl einer 10%igen (w/v) α-D-Methylmannopyranose-Lösung inkubiert, um den Komplex aus Linkerprotein, biotinylierten Antikörper und Analyt herunter zu spülen. Diese Inkubation erfolgte ebenfalls für 1 h bei 100 rpm. Zuletzt wurde die Co-IP abzentrifugiert und der Überstand wurde gefällt. Alle während der Co-IP gesammelten Proben wurden für eine SDS-PAGE aufbereitet.

4.4.2 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (Enzyme-linked Immunosobent Assay)

Der Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) gehört zu den enzymatischen Immunadsorptionsverfahren (EIA). Zur Detektion eines Analyten können verschiedene ELISA-Typen angewendet werden. Sie unterscheiden sich in der Anordnung und Abfolge der unterschiedlichen Antikörper und Antigene. (Goldsby, Kindt, Osborne, Kuby 2003)

Bei einem direkten ELISA wird das Antigen direkt auf die hydrophobe Polystyrenoberfläche der 96Well Platte adsorbiert, worauf im Anschluss verschiedene Konzentrationen eines spezifischen enzymgekoppelten Antikörpers gemessen werden. Die Auswertung erfolgt anhand eines Vergleichs zu einer Standardreihe.

Im Fall eines Sandwich ELISAs wird die Oberfläche der 96Well Platte zuerst mit einem polyklonalen Fängerantikörper beschichtet. Dieser kann nun den Analyten binden. Auf den Analyten wird ein zweiter, spezifischer, monoklonaler Antikörper gebunden, welcher

von einem Detektionsantikörper mit einem Enzymlabel gebunden wird. Diese Enzyme können z.B. die Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder alkaline Phosphatase (AP) sein. Durch eine spezifische Farbreaktion kann nun die Extinktion gemessen werden. Für quantitative Nachweise wird üblicherweise eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen (*Standardreihe*) durchgeführt, um eine Kalibrationskurve für das gemessene Signal zu erhalten. Das Signal verhält sich hier direkt proportional zur Analyt-Konzentration. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Abwandlung des Sandwich ELISAs durchgeführt.

Häufig wird jedoch auch der kompetitive Immunassay angewendet. Hierbei wird zur Detektion kein zweiter, markierter Antikörper verwendet, sondern ein markiertes Kompetitor-Antigen. Das Kompetitor-Antigen ist eine synthetische Verbindung, die dem Analyten strukturell ähnlich ist und auch am Antikörper bindet. So kommt es zur Konkurrenz zwischen Analyt und Kompetitor um die Bindestelle am Antikörper. Das Signal verhält sich hier umgekehrt proportional zur Analyt-Konzentration. Das bedeutet, je mehr Analyt in meiner Probe vorhanden ist, desto geringer wird das Signal und umgekehrt.

4.4.2.1 Nachweis der Bindeaktivität der Linkerproteine ConA-OspC und ConA-C6 mittels ELISA

Für die ELISA-Versuche wurden 96 Well EIA/RIA-Platten mit flachem Boden verwendet. Der Assay-Aufbau von ConA-C6 und ConA-OspC war identisch aufgebaut. Alle Schritte wurden, soweit nicht anders aufgeführt, bei 21 °C durchgeführt. Es wurden 190 µl PBS-Puffer in die Wells vorgelegt und anschließend 10 µl des jeweiligen Fusionsproteins hinzugegeben, sodass eine Endkonzentration von 50 µg Protein pro Well erhalten wurde. Das Protein wurde nun für 1 h bei 50 rpm auf einem Schüttler inkubiert und im Anschluss wurde jedes Well dreimal mit 200 µl PBS-Puffer für 10 min gewaschen. Nun erfolgte ein Blockierungsschritt mit der *Blocking Solution*[®] für 1 h bei 50 rpm. Bis zu diesem Punkt wurden alle Fusionsproteine gleich behandelt. Es erfolgte nun eine Inkubation mit 1 µl Serum pro Well für 1 h bei 50 rpm und anschließenden Waschschritten mit 200 µl PBS-Puffer. Die genutzten Seren waren entweder anti-OspC oder anti-VlsE (C6) positiv. Zudem wurden anti-OspC/VlsE negative Seren als Kontrollexperiment verwendet. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit einem HRP gelabelten anti-IgG Human (1:1000 Verdünnung in PBS Puffer), zur Detektion gebundener Antikörper auf dem Fusionsprotein. Nach dieser Inkubation erfolgten drei Waschschriffe mit PBS-Puffer sowie ein Wasch-

schritt mit Substratpuffer. Die HRP-TMB-Reaktion wurde ausgelöst durch Applikation von 150 µl einer Substrat-Lösung (Stammlösung: 0,1 ml TMB in DMSO (10 mg/ml) + 0,02 ml H₂O₂ (0,03 % in ddH₂O) + 1 ml Dextran-Lösung (100 mg/ml) + 8,88 ml Substratpuffer). Der Umsatz zum blauen Farbstoff wurde durch die Addition von 50 µl H₂SO₄ (24 %) gestoppt. Im Zuge dieser Affinitätsstudien wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um die Spezifität und Signifikanz der Bindung an das Fusionsprotein zu belegen. Dazu gehörte das Auslassen einzelner Schritte (z.B. das Fusionsprotein), um unspezifische Bindungen an andere Assaykomponenten ausschließen zu können.

Tabelle 29: Puffer und Reagenzien für ELISA Messungen

Puffer und Reagenzien	
Substratpuffer pH 5,5	0,1 M Natriumacetat
Stammlösung	TMB in DMSO (10 mg/ml)
H ₂ O ₂	0,03 % in ddH ₂ O
Dextran-Lösung	100 mg/ml

Der Umsatz zum blauen Farbstoff wurde quantifiziert, indem in einem Mikrotiter-Platten-Lesegerät die Absorptionen bei den Wellenlängen von 450nm und 620nm gemessen wurden. Die Messungen wurden, zur Erhebung eines Mittelwertes mit Standardabweichung, jeweils sechsfach ermittelt.

4.4.3 Immunologische Detektion auf 3D-Polymersinterkörpern

Allgemein basieren immunologische Schnelltests im Durchfluss-Assayformat auf dem gleichen biochemischen Funktionsprinzip, wie die Analyterkennung durch Rezeptorstrukturen in *Lateral Flow Assays*. Im Gegensatz zu einer einmaligen Applikation der Probe bei *Lateral Flow Assays*, erfolgt jedoch die Zugabe der Probe, des Detektionsantikörpers und zusätzlicher Waschlösungen sequentiell auf einen dreidimensionalen, porösen Formkörper, auf diesem zuvor der Fängerantikörper immobilisiert wurde. Dabei fließen nun alle Lösungen und deren enthaltenen Bestandteile, wie Analyt und letztendlich auch die Detektionsreagenzien, im Durchfluss durch den Filter. Da die Applikation einer größeren

Menge von Probelösung möglich ist, kann dadurch ein Anreicherungseffekt erzielt werden, der die Nachweisgrenze in einen sensitiveren Bereich rückt.



Abbildung 10: Mikrosäule des ABICAP[®]-Systems

Die Kernkomponente des Durchfluss-Assays sind die dreidimensionalen Filterelemente (3D-Polymer-sinterkörper). Standardmaterial für diese Filter ist Polyethylen. Die Porengrößen können je nach Herstellungsverfahren zwischen 5-100 μm variieren. Diese Polyethylen (PE)-Formkörper werden in eine Mikrosäule platziert. Diese sogenannte Mikrosäulenmethode wird von der Firma SENOVA als ABICAP[®]-System (*Antibody Immuno Column for Analytical Purpose*) vertrieben.

Die Durchführung eines Assays dauerte in der Regel zwischen 10 bis 30 Minuten bei vorheriger Immobilisierung der Fängerantikörper. Die Zeit verlängerte sich bei Anreicherung einer Probe von mehreren Millilitern Volumen. Das Auslesen des Assays konnte qualitativ mit dem Auge erfolgen oder quantitativ mit einem speziellen Photometer. Eine sehr sensitive Detektion boten poly-HRP-Antikörperkonjugate sowie Farbpartikeln aus Gold oder Latex, welche allerdings Teil eines anderen Forschungsvorhabens sind.

4.4.3.1 Immobilisierung des Linkerproteins ConA-ProtA auf 3D-Polymersinterkörpern mittels hydrophober Wechselwirkung mit anschließendem Messablauf

Bei einer Immobilisierung durch die Ausnutzung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der Polyethylenoberfläche wurden die Sinterkörper zuerst gereinigt. Dies geschah durch waschen mit Aceton und anschließend Methanol. Hierzu wurden 10 Sinterkörper in ein 10 ml Becherglas gegeben und mit Aceton übergossen. Hinzu wurde ein Rührfisch gegeben und in einen Exsikkator gestellt, welcher sich auf einer Rührplatte befand. Mittels einer Pumpe wurde nun Unterdruck im Exsikkator erzeugt, sodass die Luft aus den porösen Sinterkörpern entwich und das Aceton in die Poren eindringen konnte. Diese Prozedur wurde für 10 min durchgeführt. Anschließend wurde das Aceton gegen Methanol ausgetauscht und der Vorgang wiederholt. Zuletzt wurde das Me-

thanol gegen PBS-Puffer ausgetauscht, um direkt im Anschluss die Immobilisierung des Proteins vornehmen zu können.

Zur Immobilisierung des Linkerproteins auf den Polymersinterkörpern wurden diese in speziell dafür vorgesehene Hülsen eingebracht. Diese konnten mittels Verbindungsstücken an ein Schlauchsystem (Tygon1 Schlauch R3607 (0.91_0.64 mm) von Ismatec) angeschlossen werden, welches unter Nutzung einer Peristaltikpumpe (Minipuls 3, Gilson) die Flüssigkeit unter konstanter Geschwindigkeit (0,8 ml/min) durch die Sinterkörper durchdrückte. Das Protein wurde in PBS-Puffer auf eine Verdünnung von 10 mg/ml gebracht, in das System eingespeist und für 3 h bei RT und einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min immobilisiert. Nach den 3 Stunden wurde das System mit PBS-Puffer für eine halbe Stunde gespült und die Sinterkörper sofort für den Assay verwendet.

Die beschichteten Sinterkörper wurden in ein ABICAP[®] Röhrchen eingeführt und mit Puffer benetzt. Während des folgenden Ablaufs wurden die Reagenzien schrittweise in das ABICAP[®] Röhrchen pipettiert und die Flüssigkeit wanderte, durch Gravitationskräfte, durch die Poren des Sinterkörpers. Nun erfolgte die Applikation des Fängerantikörpers AKTry3. Dieser wurde mit einem Volumen von 1 ml und in Konzentration von 10 µg/ml appliziert. Die Interaktionszeit betrug 6 min. Nach einem Waschschrift mit 1 ml PBS-Puffer wurde das Antigen fTLI (25%ige Glycerol Mischung als Kontrollexperiment) in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Auch hier betrug die Interaktionszeit 6 min. Im Anschluss erfolgten ein Waschschrift mit PBS-Puffer und die Applikation des Detektorantikörpers AKTry2, in einer Konzentration von 10 µg/ml (bei 1 ml Volumen), für 6 min. Zuletzt wurde ein Waschschrift mit PBS-Puffer und die Applikation des HRP-markierten Detektorantikörpers, in einer Konzentration von 1 µg/ml (bei 1 ml Volumen), durchgeführt. Nach 6 min Inkubationszeit und einem erneuten Waschschrift mit Acetat-Puffer pH 5,5 wurde die Farbreaktion, durch die Zugabe von TMB Substrat (Seramun Blau© prec.), gestartet und durch einen abschließenden Waschschrift mit 1 ml Acetat-Puffer wieder gestoppt. Die Farbreaktion hatte eine Dauer von 4 min. Die optische Auswertung erfolgte mit dem Senova Photometer bei 450 nm.

4.4.3.2 Immobilisierung des Linkerproteins ConA-ProtA auf mit Mannan funktionalisierten 3D-Polymersinterkörpern und nachfolgendem Messablauf

Zur Immobilisierung von Zuckerverbindungen auf dem Polymersinterkörper wurde ein Protokoll von Degener (Dissertation Inke Degener 2004) in überarbeiteter Form verwendet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierbei wurden die hydrophoben Polyethylensinterkörper (2,5 x 5 mm) mittels nukleophiler Sauerstoffgruppen an den Hydroxyl-Gruppen funktionalisiert. Dazu wurden die Sinterkörper zuerst in einem Becherglas mit Aceton für 5 min, unter verminderten Druck gewaschen, gefolgt von einem 5 minütigen Spülschritt mit einer 50%igen Ethanol/Wasser Mischung. Das Ethanol/Wasser Gemisch wurde abgenommen und die Sinterkörper in einen Rundkolben mit 30% H₂O₂ pH 8,5 überführt. Die Lösung wurde für 6 h unter UV-Licht Einstrahlung gerührt. Danach wurden die Sinterkörper für 3 min mit Wasser gewaschen.

Zur Etablierung von Aminogruppen wurden die Sinterkörper in einer Lösung mit 0,5% (w/v) (3-aminopropyl) Triethoxysilan (APTES) in Aceton für 6 h unter vermindertem Druck auf einem Rührer inkubiert. Die Sinterkörper wurden anschließend jeweils für 5 min mit Aceton und Methanol gespült, um ungebundenes APTES zu entfernen. Zur anschließenden Immobilisierung des Zuckers auf den Polymersinterkörpern, wurden diese in speziell dafür vorgesehene Hülsen eingebracht und die Immobilisierung erfolgte, wie oben (Kapitel 4.4.3.1) bereits beschrieben, in einer angepassten Durchflussapparatur. In der Durchflussapparatur wurden die Sinterkörper mit Borat-Puffer gespült und anschließend in einer 5%igen (w/v) Lösung aus 1,4-Butandiol-diglycidyl-Ether (BDDG) in Borat-Puffer für 12 h inkubiert, bei einer Flussrate von 0,1 ml/min. Nach einem 5 minütigen Waschschrift mit Borat-Puffer wurden die Sinterkörper in einer Mannan-Lösung (1 mg/ml) für 24 h, bei einer Flussrate von 0,1 ml/min inkubiert. Abschließend wurden die Sinterkörper mit 10 ml Wasser, bei einer Flussrate von 0,5 ml/min gespült und anschließend direkt für den Assay weiterverwendet.

Die Sinterkörper wurden in ein ABICAP[®]-Röhrchen überführt und mit PBS-Puffer benetzt. Während des folgenden Ablaufs wurden die Reagenzien schrittweise in das ABICAP[®]-Röhrchen pipettiert und die Flüssigkeit wanderte durch Gravitationskraft durch die Poren des Sinterkörpers. Nun erfolgte die Anbindung des Linkerproteins an die Mannanoberfläche. Das Protein wurde in PBS-Puffer auf eine Verdünnung von 10 mg/ml gebracht und für 6 min (1 ml Volumen) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml

PBS-Puffer wurde der Fängerantikörper AKTry3 in einer Konzentration von 10 µg/ml (1 ml Volumen) appliziert. Die Interaktionszeit betrug 6 min. Nach einem Waschschrift wurde mit dem Antigen fTLI (25%ige Glycerol Mischung als Kontrollexperiment) in einer Konzentration von 10 µg/ml (1 ml Volumen) inkubiert. Auch hier betrug die Interaktionszeit 6 min. Im Anschluss erfolgten ein Waschschrift mit PBS-Puffer (1 ml Volumen) und die Applikation des Detektorantikörpers AKTry2, in einer Konzentration von 10 µg/ml, für 6 min (1 ml Volumen) und des HRP-gelabelten Detektorantikörpers, in einer Konzentration von 1 µg/ml, für 6 min (1 ml Volumen). Nach einem erneuten Waschschrift mit Acetat-Puffer pH 5,5 (1 ml Volumen) wurde die Farbreaktion durch die Zugabe von TMB Substrat (Seramun Blau© prec.) gestartet und durch einen abschließenden Waschschrift mit 1 ml Acetat-Puffer wieder gestoppt. Die Farbreaktion hatte eine Dauer von 4 min. Die optische Auswertung erfolgte mit dem Senova Photometer bei 450 nm.

4.4.4 Biosensoren

Man spricht von einem Biosensor, wenn ein biologisches Erkennungselement (=Bioaffinitätsmodul) und ein Transducer-Element in unmittelbarem räumlichen Kontakt zu einander stehen (Keusgen, 2002). Sie bilden ein abgeschlossenes, integriertes System zur spezifischen Erhebung quantitativer oder halbquantitativer Daten. Wie in unten stehender Abbildung dargestellt, steht das biologische Erkennungselement in Kontakt mit einer Umgebung in der sich potentiell interessante Analyten befinden. An der Kontaktfläche zur Umgebung werden Biomoleküle wie Antikörper, Lektine, Enzyme etc. immobilisiert. Die spezifische Bindung der vorhandenen Analyten am Erkennungselement, führt zu einer Änderung in einem oder mehreren physiko-chemischen Parametern (Brechungsindex, optische Schichtdicke etc.). Diese werden am Transducer zu einem elektrischen Signal umgewandelt. Erfolgt wegen Inkompatibilität des Analyten keine Bindung, kommt es auch zu keiner Signaltransduktion.

Von einem Biosensor wird erwartet, dass er eine hohe Spezifität gegenüber potentiellen Analyten besitzt und im gewünschten Konzentrationsbereich Daten aufnimmt (Sensitivität). Es wird eine hohe Stabilität während des Betriebs (Temperatur, pH, etc.) gefordert sowie eine kurze Ansprechzeit (Sethi 1994). Außerdem sollte er reversibel sein, d.h., mehrere Messungen zulassen, das Signal-Rausch-Verhältnis groß sein, die Detektions-

grenzen niedrig und die Kosten gering. Insbesondere sollte der Biosensor auch zur Analyse von Realproben einsetzbar sein (Gauglitz 2004).

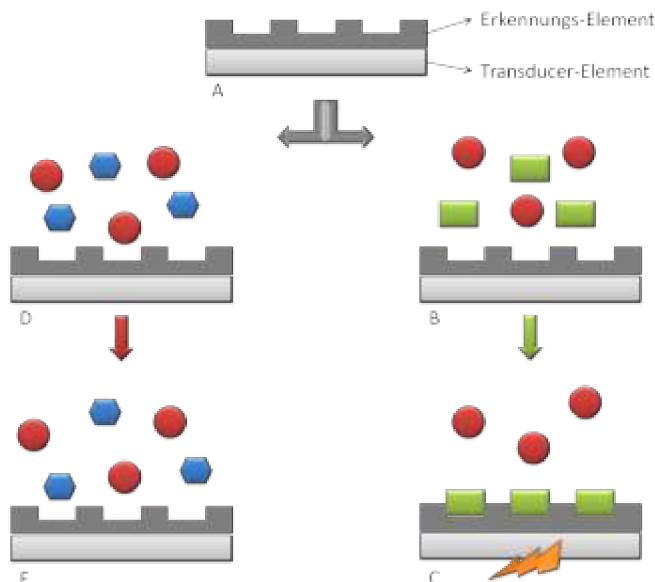


Abbildung 11: Prinzip eines

Biosensors. A: Biosensor aus einem biologischen Erkennungselement und einem Transducer-Element. B: Das biologische Erkennungs-Element kommt in Kontakt mit einer Umgebung, welche zum Erkennungs-Element kompatible Analyten enthält. C: Das Erkennungs-Element bindet den kompatiblen Analyten. Es kommt zu einer Signaltransduktion. D: Das Erkennungs-Element kommt in Kontakt mit einer Umgebung, welche zum Erkennungs-Element inkompatible Analyten enthält. E: Der inkompatible Analyt kann nicht gebunden werden. Es kommt zu keiner Signaltransduktion.

Aus der Definition des Biosensors geht hervor, dass biologische Komponenten an das Transducer-Element fixiert werden müssen. Die Immobilisation stellt einen kritischen Schritt dar, der folgenden Anforderungen gerecht werden muss (Keusgen 2002): Die immobilisierten Biomoleküle müssen eine stabile sowie reproduzierbare Schicht bilden und dürfen während der Immobilisierung nicht zerstört werden. Die Enzym- oder Bindungsaktivität der Biomoleküle darf durch die Immobilisierung nicht zu stark beeinträchtigt werden, insbesondere darf sich dessen Substratspezifität nicht ändern. Im vorliegenden Forschungsvorhaben, wurden die Methoden der Oberflächen Plasmon Resonanz und der Reflektometrischen Interferenz Spektroskopie verwendet. Diese Methoden werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

4.4.4.1 Oberflächen Plasmon Resonanz

Die Oberflächen Plasmon Resonanz (SPR) Spektroskopie erlaubt die Detektion von Molekülen bei Bindung an eine Oberfläche und kann somit der Messung von Protein-Protein Interaktionen sowie Protein-DNA Interaktionen dienen. Sie bietet verschiedene Vorteile für die Untersuchung von Bindeeigenschaften. Insbesondere die Möglichkeit Bindeeig-

nisse in Echtzeit zu erfassen sowie die Eigenschaft, Proteine oder DNA ohne Markierung zu detektieren, was eine Minimierung der Störfaktoren im Bindeereignis bedeutet. Die Technik beruht auf der Detektion des Laserstrahls bei Verschiebung im Reflexionswinkel, sobald eine molekulare Interaktion den Brechungsindex auf der Oberfläche des verwendeten Goldprismas, verändert (Abb. 12).

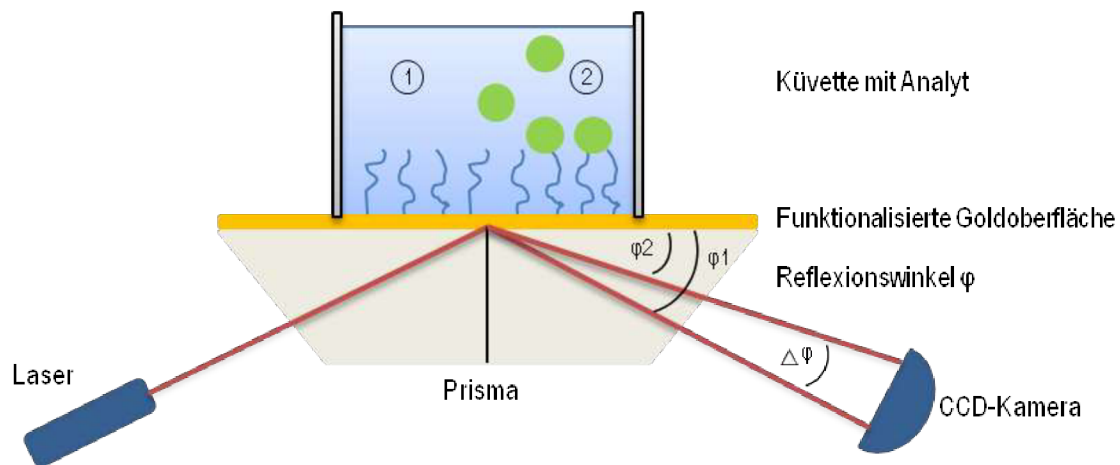


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines SPR-Biosensors

Vor der Zugabe eines Biomoleküls wird eine Basislinie aufgezeichnet (Abb. 13). Mit der Zugabe und Anbindung eines Biomoleküls verändern sich der Brechungsindex und der daraus resultierende Reflexionswinkel. Dies führt letztendlich zu einem Anstieg im Sensorsignal. Diese Phase wird auch Assoziationsphase genannt. Dieser Phase schließt sich die sogenannte Gleichgewichtsphase an. Hier findet keine weitere Anbindung des Analyten an die Oberfläche statt oder es hat sich ein Gleichgewicht in der Bindung eingestellt. Nach einer angemessenen Inkubationszeit werden mittels eines Puffers die nicht gebundenen Biomoleküle von der Oberfläche wieder entfernt und es verbleiben nur die gebundenen Moleküle auf der Oberfläche. In dieser sogenannten Dissoziationsphase kommt es meist zu einem Abbau im Signal. Nach der Dissoziationsphase stellt sich wieder eine Basislinie ein, sofern die gebundenen Moleküle stabil auf der Oberfläche verbleiben. Im Anschluss könnte nun eine weitere Assoziationsphase erfolgen.

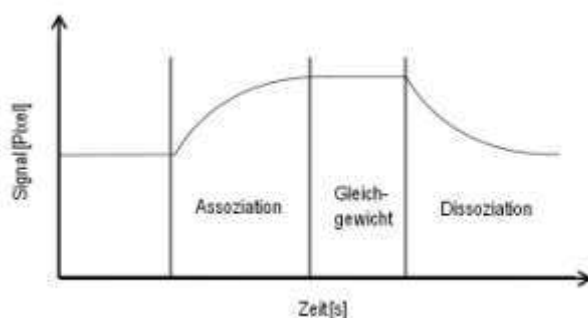


Abbildung 13: Kurvenverlauf Biosensor

Für die Messungen wurde der Plasmonic[®] Biosensor (Plasmonic, Wallenfels, Germany) verwendet. Er beruht auf einem Küvettensystem, was den Vorteil bietet, Scherkräfte während der Interaktionsanalyse zu vermeiden. Die Interaktionsstudien wurden auf mit Gold beschichteten Prismen durchgeführt.

führt.

Während der Messungen wurden zum Spülen innerhalb der Küvetten verschiedene Mixmodi angewendet. Diese setzten sich aus unterschiedlichen Zeiten im Hinblick auf die Pipettierdauer zusammen. Die folgende Tabelle (Tab. 30) gibt eine Übersicht über die verschiedenen Programme.

Tabelle 30: Übersicht über die voreingestellten Mixtypes SPR

Mixmodi	
Mischverfahren	Anwendung
Mixtype 0	Einmaliges Pipettieren von Probe in die Küvette
Mixtype 1	Für das Pipettieren von hochbrechenden Lösungen. Interaktionszeit mindestens 1,5 Minuten, es wird für 1 min 20 s gemischt
Mixtype 2	Zum Waschen nach Entnahme hochbrechender Lösungen. Der Modus wurde optimiert auf eine zuvor entleerte Küvette, in die die hochbrechende Lösung gegeben wird. Es wird für 20 s gemischt.
Mixtype 3	Für Protein-Interaktionen. Interaktionszeit mindestens 4,2 Minuten, es wird für 4 min, 7 s mit Wartezeiten gemischt.
Mixtype 4	Für Protein-Interaktionen. Interaktionszeit mindestens 2 Minuten, es wird für 1 min, 55 s gemischt.
Mixtype 5	Für Protein-Interaktionen. Interaktionszeit mindestens 4 Minuten, es wird für 3 min, 55 s gemischt.
Mixtype 6	Für Protein-Interaktionen. Interaktionszeit mindestens 6 Minuten, es wird für 5 min, 55 s gemischt.

4.4.4.1.1 Herstellung von Zucker Oberflächen für SPR

- 1.** Die Prismen wurden in einer Halterung platziert und zuerst für 5-10 min mit Aceton gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation in einer Mischung aus 0,1 M KOH in wässriger Lösung und 30% H_2O_2 (1:1, v/v) für 20 min bei 60°C. Die 30%ige Wasserstoffperoxidlösung wurde langsam zu der KOH-Lösung hinzu getropft.
- 2.** Reste der Lösung wurden durch 4-maliges Waschen der Prismen in 100 ml ddH₂O für je 60 s in einem Ultraschallbad entfernt.
- 3.** ddH₂O-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 60 s, in 40 ml Methanol, in einem Ultraschallbad entfernt.
- 4.** Methanol-Reste wurden von den Chips durch 3-maliges Waschen für je 60 s, in 40 ml Toluol, in einem Ultraschallbad entfernt.
- 5.** Die Prismen wurden für 6 h in je 6 ml einer 1%-igen (m/m) APTES-Lösung, in Toluol, bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (350 rpm) inkubiert.
- 6.** Überschüssiges APTES wurde durch 3-maliges Waschen für je 60 s, in 40 ml Toluol, entfernt.
- 7.** Toluol-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 60 s, in 40 ml Methanol, entfernt.
- 8.** Methanol-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 60 s, in 100 ml ddH₂O, entfernt.
- 9.** Die Prismen wurden in Schnappdeckelgläschen mit je 6 ml BDDG-Lösung (3ml/10ml 1,4 Butandiol diglycidylether (BDDG) in 0,2 mol/l Borat-Puffer pH 10 + 6 mg/ml NaBH_4) überführt und 12 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (350 rpm) inkubiert.
- 10.** Danach wurde ungebundenes BDDG durch 3-maliges Reinigen für je 60 s, in 100 ml ddH₂O, von den Prismen entfernt.
- 11.** Anschließend wurden die Prismen 24 h in Schnappdeckelgläschen, befüllt mit je 6 ml Zucker-Lösung (z.B. Mannan-Lösung: 5 mg/ml Mannan in 0,2 mol/l Borat-Puffer pH 10), bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (350 rpm) inkubiert.

12. Ungebundener Zucker wurde durch 3-maliges Reinigen die Prismen für je 60 s, in 100 ml ddH₂O, entfernt.

13. Die Trocknung und Lagerung der Prismen erfolgte im Exsikkator unter Vakuum.

4.4.4.1.2 Herstellung von C-18 Oberflächen für SPR

OF-Modifikation mittels 3-Octadecyltrimethoxysilan:

1. Jeweils 5 Prismen wurden in einer extra angefertigten Teflonhalterung positioniert, so dass jeweils ein Steckplatz zwischen den Prismen frei war. Die Chips wurden samt Halterung in einen Färbetrog mit Aceton überführt und für 10 min im Ultraschallbad gereinigt. Danach wurden die Chips in der Halterung, unter einer gentechnischen Sicherheitswerkbank, getrocknet.

2. Die Prismen wurden in einer Halterung platziert und zuerst für 5-10 min mit Aceton gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation in einer Mischung aus 0,1 M KOH in wässriger Lösung und 30% H₂O₂ (1:1, v/v) für 20 min bei 60°C. Die 30%ige Wasserstoffperoxidlösung wurde langsam zu der KOH Lösung hinzu getropft.

3. Reste der Lösung wurden durch 4-maliges Waschen der Prismen in 100 ml ddH₂O für je 60 s in einem Ultraschallbad entfernt.

4. Reste von ddH₂O wurden durch dreimaliges Spülen der Prismen, in jeweils 40 ml Methanol, für jeweils 2 min entfernt.

5. Reste von Methanol wurden durch dreimaliges Spülen der Prismen, in jeweils 40 ml Toluol, für jeweils 2 min entfernt.

6. Die Prismen wurden dann in Zentrifugengläser, befüllt mit jeweils 6 ml 1%iger (m/m) 3-Octadecyltrimethoxysilan-Lösung in Toluol, überführt und für 6 h (RT, Schüttler 300 rpm) inkubiert.

7. Reste von 3-Octadecyltrimethoxysilan wurden durch dreimaliges Spülen der Prismen, in jeweils 40 ml Toluol, für jeweils 2 min entfernt (Schüttler, 250 rpm).

8. Reste von Toluol wurden durch dreimaliges Spülen der Prismen, in jeweils 40 ml Methanol, für jeweils 2 min entfernt (Schüttler, 250 rpm).

9. Reste von Methanol wurden durch dreimaliges Spülen der Prismen, in jeweils 100 ml ddH₂O, für jeweils 2 min entfernt (Schüttler, 250 rpm).

10. Zur Lagerung wurden die Prismen unter einer gentechnischen Sicherheitswerkbank mit der Goldbeschichtung nach oben, in verschließbare Petrischalen gelegt.

4.4.4.1.3 Analyseablauf mittels SPR

1. Aufnahme einer Basislinie für 300 sec.

2. Applikation von Proteinen mit Mixmode 4 (jeweils 10 µl).

3. Nach Applikationen von Proteinen wurde eine Wartezeit von 400 sec eingehalten.

4. Spülschritte nach Wartezeiten wurden mit Mixmode 1 (3x) und Mixmode 0 (2x) durchgeführt. Danach erfolgte die nächste Applikation von Proteinen.

5. Zum Beenden einer Messung wurden 10 µl Puffer in die Küvette mit Mixmode 1 dazu addiert und anschließend erfolgte nochmal die Aufnahme einer Basislinie für 300 sec.

Eingesetzte Konzentrationen:

Linker-/ Fusionsproteine jeweils 250 µg/ml

Antikörper jeweils 250 µg/ml

Antigene jeweils 250 µg/ml

α-D-Methylmannopyranose: 20% (w/v) in PBS Puffer

Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurde das Programm Origin pro 8 (OriginLab, USA) verwendet.

4.4.4.2 Reflektometrische Interferenz Spektroskopie

Das BIAffinity der Analytik Jena GmbH misst die Änderung der optischen Schichtdicke während Bioaffinitätsexperimenten. Das zugrunde liegende Messverfahren nutzt die Prinzipien der Reflektometrischen Interferenz Spektroskopie (RIfS). Die RIfS ist eine Methode zur biologischen Interaktionsanalyse, die in optischen Biosensoren Anwendung findet. Sie findet hier ohne die chemische Modifizierung des Analyten durch Markierungen statt.

Eine Weißlichtquelle strahlt Licht von unten auf die Glasoberfläche, auf der bereits eine Schicht eines Analyten immobilisiert worden ist (Abb. 14 A). An jeder Grenzfläche wird der Strahl teilweise gebrochen und teilweise reflektiert. Die reflektierten Teilstrahlen überlagern einander. Durch die unterschiedlich langen Wege, die der Lichtstrahl wegen der optischen Eigenschaften zurücklegt, kommt es zu einer Phasenverschiebung der einzelnen Teilstrahlen (Abb. 14 B). Das führt zu Interferenzmustern, die vom Detektor registriert werden. Bei Auflagerung weiterer Schichten ändern sich die Interferenzmuster, was sich in einer Änderung des Signals äußert. Solange keine Immobilisierung stattfindet, wird eine Basislinie aufgezeichnet. Mit der Injektion einer Biokomponente verändern sich die Interferenzmuster, aufgrund von Änderungen in den optischen Eigenschaften der sich neu etablierenden Schicht (Abb.13).

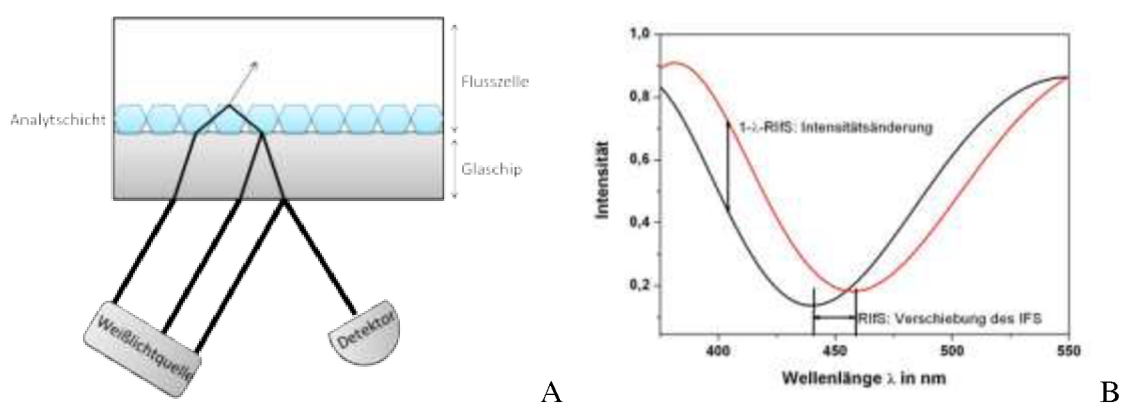


Abbildung 14: Prinzip der Reflektometrischen Interferenz Spektroskopie

Die Affinitätsstudien wurden auf Glaschips durchgeführt, die von der Analytik Jena GmbH zur Verfügung gestellt wurden. Die Chips waren dreischichtig aufgebaut. Auf eine dünne Glasschicht folgte eine 10 nm dicke Tantalpentoxidschicht (Tantal(V)-O-oxid, Ta_2O_5) und auf diese eine dickere Siliziumdioxidschicht.

4.4.4.2.1 Herstellung von Zucker Oberflächen für die RIS

1. Die Chips wurden in einer Halterung platziert und in 40 ml NaOH (6 mol/l), über 2 min, in einem Ultraschallbad inkubiert.

- 2.** NaOH-Reste wurden durch 4-maliges Waschen, in 100 ml ddH₂O, für 45 s in einem Ultraschallbad entfernt.
- 3.** Anschließend wurden sie 30 min, in 40 ml Piranha-Lösung (24 ml H₂SO₄ (96%) + 16 mL H₂O₂ (30%)), im Ultraschallbad inkubiert.
- 4.** Reste der Piranha-Lösung wurden durch 4-maliges Waschen der Chips, in 100 ml ddH₂O, für je 60 s in einem Ultraschallbad entfernt.
- 5.** ddH₂O-Reste wurden durch 3-maliges Waschen, für je 60 s, in 40 ml Methanol, im Ultraschallbad entfernt.
- 6.** Methanol-Reste wurden von den Chips durch 3-maliges Waschen, für je 60 s, in 40 ml Toluol, in einem Ultraschallbad entfernt.
- 7.** Die Chips wurden für 6 h in je 6 ml einer 1%-igen (m/m) APTES-Lösung, in Toluol bei Raumtemperatur, auf einem Schüttler (350 rpm) inkubiert.
- 8.** Überschüssiges APTES wurde durch 3-maliges Waschen für je 60 s, in 40 ml Toluol entfernt.
- 9.** Toluol-Reste wurden durch 3-maliges Waschen, für je 60 s, in 40 ml Methanol, entfernt.
- 10.** Methanol-Reste wurden durch 3-maliges Waschen für je 60 s, in 100 ml ddH₂O, entfernt.
- 11.** Die Chips wurden ungetrocknet in Schnappdeckelgläschen mit je 6 ml BDDG-Lösung (3ml/10ml 1,4 Butandiolglycidylether (BDDG) in 0,2 mol/l Borat-Puffer pH 10 + 6 mg/ml NaBH₄) überführt und 12 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (350 rpm) inkubiert.
- 12.** Danach wurde ungebundenes BDDG durch 3-maliges Reinigen für je 60 s, in 100 ml ddH₂O, von den Chips entfernt.
- 13.** Anschließend wurden die Chips 24 h in Schnappdeckelgläschen, befüllt mit je 6 ml Zuckerlösung (z.B. Mannanlösung: 5 mg/ml Mannan in 0,2 mol/l Borat-Puffer pH 10), bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (350 rpm) inkubiert.
- 14.** Ungebundener Zucker wurde durch 3-maliges Reinigen der Chips für je 60 s, in 100 ml ddH₂O, entfernt.

15. Die Trocknung und Lagerung der Chips erfolgte im Exsikkator unter Vakuum.

4.4.4.2.2 Herstellung von C-18 Oberflächen für die RfS

Oberflächenmodifikation mittels 3-Octadecyltrimethoxysilan

1. Jeweils 5 Glaschips wurden in einer extra angefertigten Teflonhalterung positioniert, so dass jeweils ein Steckplatz zwischen den Chips frei war. Die Chips wurden samt Halterung in einen Färbetrog mit Aceton überführt und für 10 min im Ultraschallbad gereinigt. Danach wurden die Chips in der Halterung in einer gentechnischen Sicherheitswerkbank getrocknet.

2. Die Chips wurden in einer anderen Teflon-Halterung, in 40 ml NaOH (6 mol/l) über 2 min in einem Ultraschallbad, inkubiert. (Sie wurden in eine neue Halterung überführt, damit keine Aceton-Reste in die NaOH-Lösung übertragen werden.)

3. Anschließend wurden die Chips durch viermaliges Waschen, in 100 ml ddH₂O, für 2 min in einem Ultraschallbad, von NaOH-Resten befreit.

4. Dann folgte die Inkubation der Chips, in 40 ml Piranha-Lösung (24 ml H₂SO₄ (96%) + 16 mL H₂O₂ (30%)) über 30 min, in einem Ultraschallbad.

5. Reste von Piranha-Lösung wurden durch viermaliges Spülen der Chips, in 100 ml ddH₂O für 2 min, in einem Ultraschallbad entfernt.

6. Reste von ddH₂O wurden durch dreimaliges Spülen der Chips, in jeweils 40 ml Methanol, für jeweils 2 min entfernt.

7. Reste von Methanol wurden durch dreimaliges Spülen der Chips, in jeweils 40 ml Toluol, für jeweils 2 min entfernt.

8. Die Chips wurden dann in Zentrifugengläser, befüllt mit jeweils 6 ml 1%-iger (m/m) 3-Octadecyltrimethoxysilan-Lösung in Toluol, überführt und für 6 h (RT, Schüttler 300 rpm) inkubiert.

9. Reste von 3-Octadecyltrimethoxysilan wurden durch dreimaliges Spülen der Chips, samt Halterung, in jeweils 40 ml Toluol, für jeweils 2 min, entfernt (Schüttler, 250 rpm).

10. Reste von Toluol wurden durch dreimaliges Spülen der Chips, in jeweils 40 ml Methanol für jeweils 2 min, entfernt (Schüttler, 250 rpm).

11. Reste von Methanol wurden durch dreimaliges Spülen der Chips, in jeweils 100 ml ddH₂O, für jeweils 2 min, entfernt (Schüttler, 250 rpm).

12. Zur Lagerung wurden die Chips jeweils in verschraubbare Plastikröhrchen gegeben und unter Gentechnischen Sicherheitswerkbank gestellt.

4.4.4.2.3 Analyseablauf mittels RIfS

1. Konstanter Pufferstrom von 5 µl/min

2. Aufnahme einer Basislinie für 300 sec.

3. Applikation von Proteinen mittels Injektionsschleife bei Flussrate von 5 µl/min (jeweils 100 µl).

4. Nach Applikationen von Proteinen (Analyt/Antikörper) wurde eine Wartezeit von 600 sec eingehalten, um ein konstantes Gleichgewichtssignal zu bekommen.

5. Nach Beendigung der Applikation wurde automatisch nach Injektionen vom Gerät der Pufferstrom wieder eingeleitet und der Spülschritt durchgeführt. Diese Phase ist die Dissoziationsphase.

6. Zum Beenden einer Messung erfolgte nochmal die Aufnahme einer Basislinie für 300 sec.

Eingesetzte Konzentrationen:

Linker-/ Fusionsproteine jeweils 250 µg/ml

Antikörper jeweils 250 µg/ml

Antigene jeweils 250 µg/ml

α-D-Methylmannopyranose: 20% (w/v) in PBS Puffer

Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurde das Programm Origin pro 8 (OriginLab, USA) verwendet.

4.4.4.3 Mannanfunktionalisierung von C-18-Oberflächen

Als Weiterentwicklung der Mannanfunktionalisierung, die in den Kapiteln 4.4.4.1.1 und 4.4.4.2.1 angesprochen wurden, wurde eine Mannanfunktionalisierung auf C-18-Oberfläche im Biosensor entwickelt. Hierzu wurden die Glaschips/Goldprismen mit 3-Octadecyltrimethoxysilan funktionalisiert (Kapitel 4.4.4.1.2 / 4.4.4.2.2) und in die Halterung des Biosensors eingesetzt. Nun konnte in Echtzeit eine Mannanfunktionalisierung erfolgen. Hierzu wurde eine Mannanlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst in PBS-Puffer hergestellt. Diese Lösung wurde nun auf die C-18-Oberfläche appliziert und für 10 min inkubiert. Bei RIfS erfolgte die Applikation für 10 min, bei einer Flussrate von 5 ml/min, bei SPR wurden 10 µl mit Mixtype 6 in die Küvette pipettiert und anschließend 10 min inkubiert. Diese Unterschiede ergaben sich selbsterklärend durch den Geräteaufbau. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Oberfläche mit PBS-Puffer gespült, um ungebundenes Mannan zu entfernen und die Oberfläche konnte sofort für den nachfolgenden Assay genutzt werden.

Diese Funktionalisierung konnte nur mit Mannan erfolgen. Mit Dextran war sie nicht möglich. Hintergrund dessen ist, dass die Mannanpräparation aus *Saccharomyces cerevisiae* nach dem Protokoll von Haworth (1937) erfolgte. Hierbei wird das Mannan aus der Zellwand gelöst, allerdings wird der Proteinanker nach der Aufreinigung nicht entfernt. Aus diesem Grund war es möglich das hydrophile Mannan, mittels dieses Proteinankers, hydrophob auf der C-18-Oberfläche zu immobilisieren.

4.4.5 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Measurement, AFM) ist ein Verfahren mit dem, bei beliebigem Material, die Topographie mit bis zu atomarer Orstauflösung abgebildet und vermessen werden kann.

Die Probe wird dabei mit einer Spitze, angebracht auf einem mikroskopischen Taster (Cantilever), abgerastert. Mit diesem Cantilever wird leicht auf die Probenoberfläche gedrückt, sodass das System aus Cantilever und Spitze beim Abfahren der Probe der Oberflächentopographie folgt. Unebenheiten üben dann Kräfte auf den Cantilever aus, dieser verbiegt sich, wobei diese Biegung gemessen werden kann. Letztendlich lässt sich mit dieser Verbiegungsmessung die Topographie rekonstruieren. Für die Messung der Bie-

gung des Cantilevers wird häufig das Lichtzeigerprinzip verwendet. Dabei wird ein fokussierter Laserstrahl auf das Ende des Cantilevers gerichtet. Von dort wird der Laserstrahl auf eine segmentierte Photodiode reflektiert. Ändert sich nun die Biegung, beeinflusst das den Einfallswinkel des Laserpunktes auf der Photodiode (Binnig, Quate, Gerber 1986).

Durch Aufnahmen der Biosensorchipoberfläche sollte die Qualität der Funktionalisierung mit Zucker ermittelt werden sowie die daraus resultierende Oberflächenbelegung mit Linkerprotein.

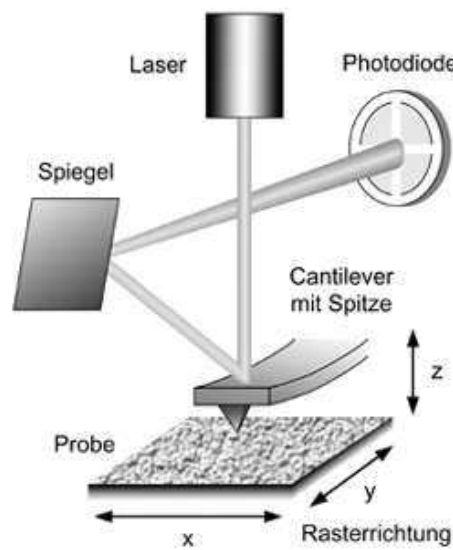


Abbildung 15: Schema eines Rasterkraftmikroskops. Quelle: Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM)

Nach der erfolgten Oberflächenchemie wurden Rasterkraftmikroskopie (AFM)-Aufnahmen der mit Dextran funktionalisierten Glasoberflächen angefertigt. Die AFM Aufnahmen wurden mit einem JPK Nano WizardTM (JPK Instruments, Berlin, Deutschland) im „tapping mode“ durchgeführt. Für alle Messungen wurden AFM Cantilevers (NSC16/Si₃N₄/AlBS) (Micromasch, Estland) mit ultrascharfen Spitzen und einer Länge von 230µm benutzt. Die Resonanz Frequenz lag bei 170kHz und die konstante nominale Kraft lag bei 45 N/m. Die Rauigkeit der Oberfläche wurde ermittelt durch die *root mean square* (rms) Gleichung (1):

$$\delta = \sqrt{\frac{1}{N} \times \sum_{i=1}^N z_i^2} \quad (1)$$

Die Variable z_i^2 definiert die vertikale Abweichung von der ideal flachen Oberfläche.

5 Ergebnisse

Innerhalb dieses Kapitels werden die Ergebnisse aller angefertigten Linker-/Fusionsproteine dargestellt. Die Ergebnisse sind anhand der Themengebiete geordnet, wie sie auch schon im Einleitungsteil angesprochen wurden. Zuerst sind ein paar Vorversuche aufgeführt. Danach werden die Ergebnisse des Linkerproteins ConA-SAv dargelegt sowie deren Mutanten. Neben den grundlegenden Ergebnissen wie DNA-Restriktionsanalysen und SDS-PAGE, sind die RfS und SPR Messungen sowie die Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation gezeigt.

Im Anschluss erfolgt eine kurze Überleitung in den nächsten Themenbereich, der Borreliosediagnostics. Hier werden die zwei Fusionsproteine ConA-OspC und ConA-C6 getrennt voneinander dargestellt. Ebenfalls gegliedert nach den Bereichen der grundlegenden Ergebnisse, wie DNA-Restriktion und SDS-PAGE, gefolgt von den SPR und RfS Messungen sowie Studien mittels ELISA.

Im letzten Bereich des Kapitels werden die Ergebnisse des Linkerproteins ConA-ProtA aufgeführt. Auch hier werden die allgemeinen Ergebnisse angesprochen, worauf die Etablierung eines Modell Assays mittels SPR und RfS erfolgt. Im Anschluss werden diese Ergebnisse für die Detektion von fTLI im Blutserum übertragen. Zudem werden *Proof-of-Principle* Messungen auf der dreidimensionalen Oberfläche gezeigt und diese im Anschluss mit Realproben geprüft, welche die *Point-of-Care* Diagnostik veranschaulichen sollen.

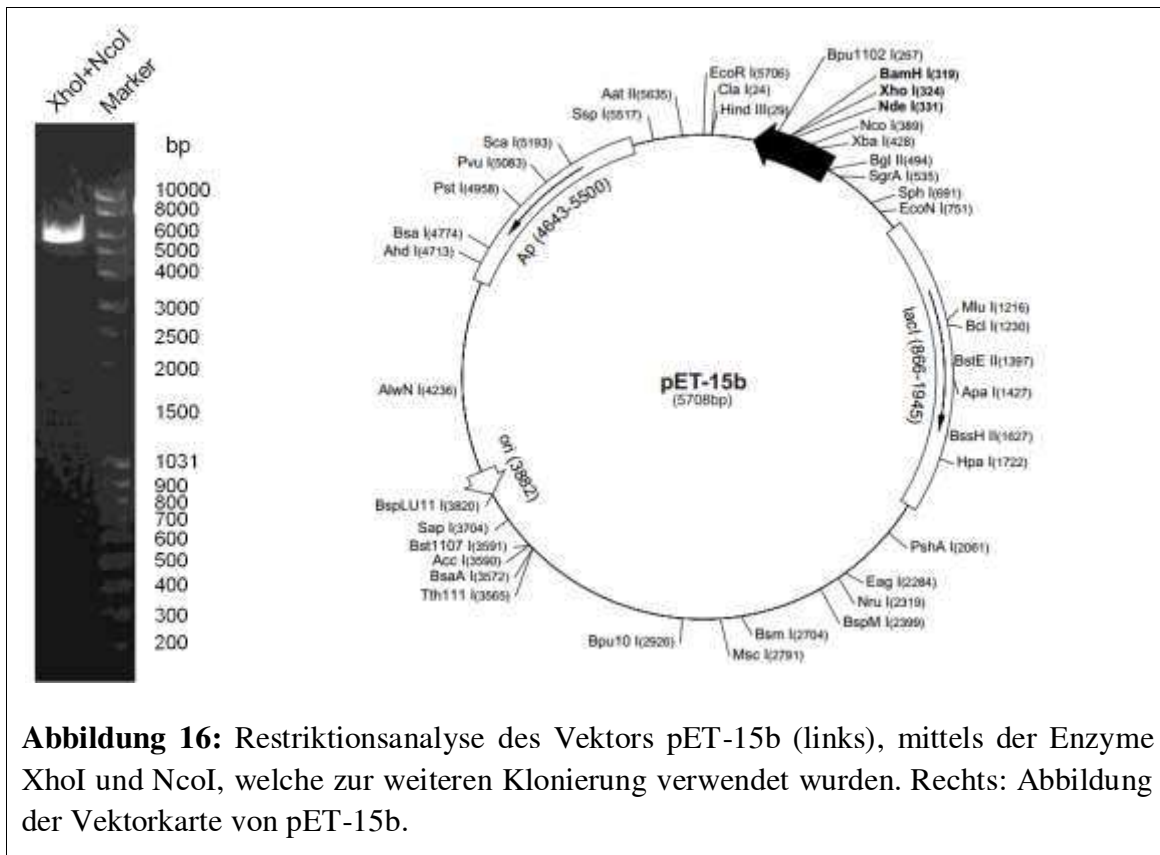
Im letzten Unterkapitel sind die Ergebnisse der AFM Aufnahmen einer mit Dextran funktionalisierten Oberfläche dargestellt.

5.1 Vorversuch

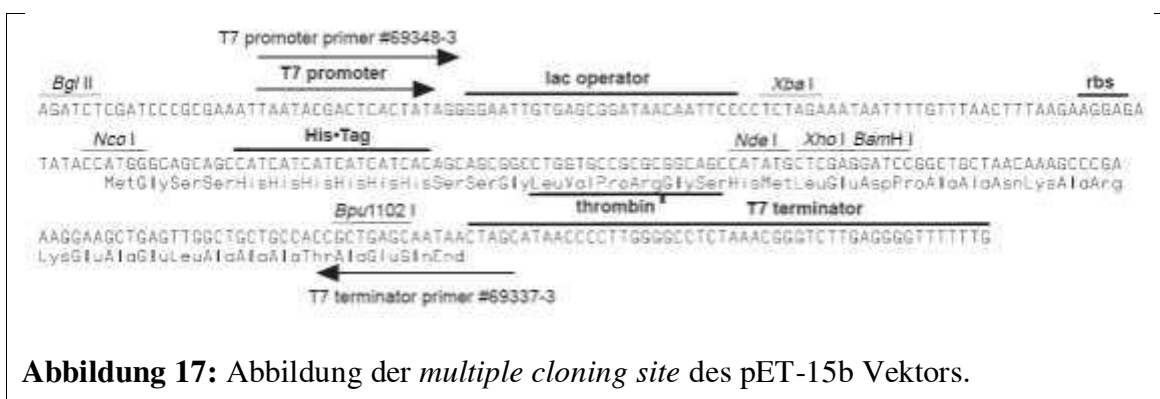
5.1.1 Kontrolle des Expressionsvektors pET-15b zur weiteren Klonierung

Der pET-15b Vektor kann für Klonierung sowie Expression genutzt werden. Dafür besitzt er einen T7 Promotor sowie T7 Terminator, welcher durch das ebenfalls auf dem Vektor

befindliche lacI Gen mit IPTG induzierbar ist. Zur Aufrechterhaltung eines Selektionsdrucks kann Ampicillin verwendet werden.



Der pET-15b Vektor besitzt innerhalb seiner *multiple cloning site* ein His-Tag am N-Terminus und eine anschließende Thrombin-Schnittstelle. Zur Klonierung wurden allerdings in allen Konstrukten die Schnittstellen *NcoI* und *XhoI* verwendet, wodurch das His-Tag und die Thrombin-Schnittstelle herausgeschnitten wurden. Durch die Nutzung der *NcoI* Schnittstelle blieb das Start Codon erhalten und musste nicht zusätzlich wieder eingefügt werden.



5.2 ConA-SAv

5.2.1 Klonierungsstrategie, Gensequenzen, Restriktionsanalysen ConA-SAv

Die Gensequenzen der Bestandteile pre-pro-ConA und SAv wurden nach gründlicher Literaturrecherche ausgewählt und am Computer virtuell kloniert. Die beiden Gensequenzen wurden hierbei mit einem 6x Alanin-Linker zusammengefügt, welcher eine starre Eigenschaft besitzt. Während flexible Linker den Vorteil besitzen die funktionalen Domänen passiv, mit einer Möglichkeit zur Bewegung, zu verbinden, kann dieses Fehlen der Starrheit ein limitierender Faktor sein. Es gibt mehrere Beispiele in der Literatur, aus denen hervorgeht, dass der Gebrauch flexibler Linker in einer geringen Expressionseffizienz sowie einem Funktionsverlust resultieren kann (Amet, Lee, Shen 2009; Maeda et al. 1997). Diese mögliche Ineffektivität von flexiblen Linkern wird auf die ineffiziente Separation der Proteindomänen und den daraus resultierenden Interaktionsmöglichkeiten untereinander zurückgeführt. Daher werden starre Linker, insbesondere unter dem Aspekt verwendet, eine festgesetzte Distanz zwischen zwei Proteindomänen zu erzeugen, um die unabhängige Funktion beider zu erhalten (Chen, Zaro Shen 2013). Ein zusätzlich C-terminal eingefügtes 6 x His-Tag sollte für nachfolgende Aufreinigungsschritte, über eine Nickel-NTA Säule, nach der Proteinexpression dienen.

Nach dieser Vorarbeit wurde die Gensequenz an die Firma GENEART AG (Regensburg, Deutschland) weitergeleitet, wo eine Codon-Usage-Optimierung durchgeführt wurde und das Genkonstrukt synthetisch hergestellt wurde. Der erhaltene Zwischenvektor, der die synthetische Gensequenz von ConA-SAv enthielt, wurde nun zur Subklonierung in den pET-15b Vektor eingesetzt.

Nach Klonierung des ConA-SAv in die *multiple cloning site* des pET-15b wurde eine analytische Restriktionsanalyse der erhaltenen Klone durchgeführt und die positiven Klone wurden zur Sequenzanalyse zur Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) geschickt. Nach erfolgreicher Sequenzanalyse wurde ein positiver Klon ausgewählt. Dieser enthielt, wie zuvor errechnet, ein Vektor-Fragment von 5666 Bp und ein Insert-Fragment von 1221 Bp. Die Gensequenz des Konstrukts kann im Anhang eingesehen werden.

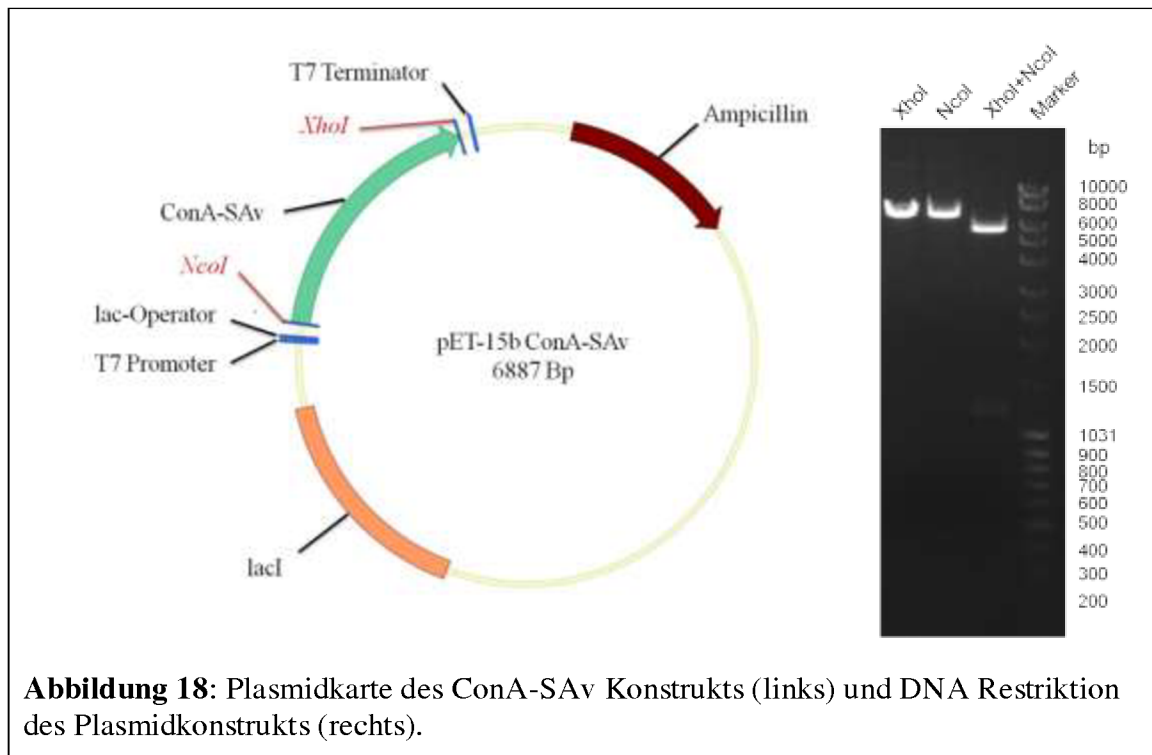


Abbildung 18 zeigt das erhaltene genetische Konstrukt, nach erfolgreicher Subklonierung von ConA-SAv in den pET-15b Vektor. Der pET-15b Vektor behält dabei das lacI Gen und einen lac Operator, welcher eine IPTG-induzierbare Proteinexpression ermöglichte. Zudem beinhaltete der Vektor nach Subklonierung weiterhin einen T7 Promotor sowie einen Terminator und eine Ampicillinresistenz, mit der ein konstanter Selektionsdruck aufrecht erhalten werden konnte.

5.2.2 Expressionskinetik und Proteinaufreinigung von ConA-SAv

Der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) wurde mit dem pET-15b ConA-SAv Plasmid transformiert und es wurden Klone auf LB-Agar Platten mit Ampicillin selektioniert. Die positiven Klone wurden zur weiterführenden Analytik für eine Expressionskinetik verwendet. Die vorherbestimmte Größe des ConA-SAv-Proteins betrug, laut ExPASy Prot Param tool (Switzerland), 43 kDa, errechnet anhand der vorbestimmten Aminosäuresequenz.

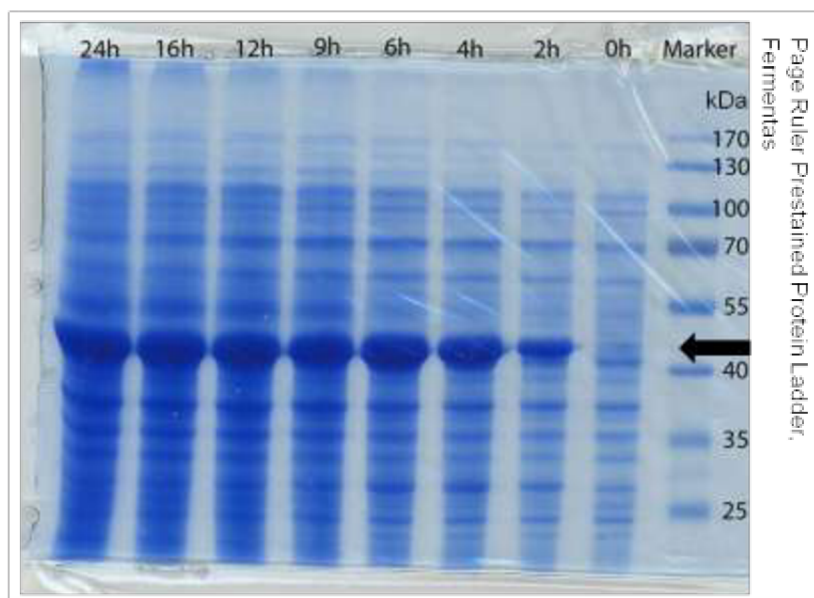


Abbildung 19: Expressionskinetik von ConA-SAv. Probenentnahme nach 0, 2, 4, 6, 9, 12, 16 und 24 h nach IPTG-Induktion. Die induzierte Bande zeigt sich bei 43 kDa. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific

Für die Aufnahme der Expressionskinetik wurden 250 ml LB-Flüssigmedium mit 9 ml Vorkultur angeimpft und bei 220 rpm bei 37°C bis zu einer OD600 von 0,8 hochgezogen. Zu diesem Zeitpunkt wurde die erste Probe (0 h) genommen. Dann erfolgte die Induzierung mit 250 µl 1 M IPTG-Lösung. Nach 2 h, 4 h, 6 h, 9 h, 12 h, 16 h und 25 h wurden Proben entnommen und anschließend für eine SDS-PAGE aufbereitet. Das Ergebnis der SDS-PAGE ist in Abbildung 19 zu sehen. Wie dort zu erkennen ist, lag das vorherbestimmte und das tatsächliche Molekulargewicht des ConA-SAv sehr nahe beieinander. Anhand der Expressionskinetik wurde eine Expressionszeit von 6 h nach IPTG-Zugabe angesetzt.

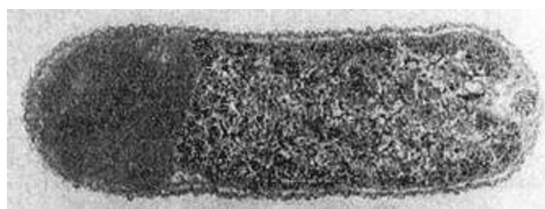


Abbildung 20: Mikroskopische Darstellung von Inclusion bodies in *E. coli*. Poröse Ablagerung im linken Pol des Bakteriums (King, Betts 1999)

Im nächsten Schritt sollte das Linkerprotein über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt werden. Dieser Ansatz stellte sich als unbrauchbar heraus, da in weiteren Analysen zu erkennen war, dass das Protein unlöslich in Inclusion bodies (Einschlusskörperchen siehe Abbildung 20) in der Zelle vorlag.

Inclusion bodies sind Proteinaggregate, die

sich in *E. coli* zumeist an den Polen der Zellen ansammeln und größtenteils aus fehlerhaft oder unvollständig gefalteten Proteinen bestehen. Die bei Überexpression von rekombinanten Proteinen häufig gebildeten, sphärischen Inclusion bodies haben in *E. coli* einen Durchmesser von 0,2 bis 1,5 μm und akkumulieren, bis zu einem Anteil von über 50 % des Gesamtzellproteins (Baneyx, Mujacic 2004). Die Inclusion bodies bestehen in der Regel aus vollständig synthetisierten Proteinen, die allerdings nur partiell gefaltet sind. In der Regel findet sich ein Inclusion body pro Zelle, wobei diese nicht membrangebunden sind. Sie verfügen über eine poröse Struktur, wobei es sich, nicht wie nach bisheriger Meinung, um eine unstrukturierte Ansammlung von Polypeptiden handelt, sondern um eine definierte Struktur (Ventura, Villaverde 2006). Normalerweise sind Inclusion bodies häufig ein diagnostisches Kriterium zum Nachweis einer viralen Infektion oder Proteinfaltungserkrankungen, z.B. bei der Alzheimer Krankheit, Huntington oder auch Prionenerkrankungen.

Zur Untersuchung, in welchem Extrakt sich das Linkerprotein befand, wurde eine SDS-PAGE mit den verschiedenen Proteinextrakten nach einer Testexpression durchgeführt (Abb. 21). Im Gesamtzellextrakt sowie im unlöslichen Zellextrakt, konnte das Linkerprotein nachgewiesen werden (Lane 1 und 3 in Abb. 21). Im löslichen Protein-Bestandteil war das ConA-SAv nicht zu finden. Somit stellte sich die ursprüngliche Idee, einer Säulenaufreinigung des Zelllysates direkt nach Aufschluss der Zellen, als unbrauchbar heraus. Daraufhin wurde ein Protokoll für eine Inclusion body-Aufreinigung entwickelt, um das Protein von den anderen in der Zelle enthaltenen, unlöslichen Proteinen zu trennen. Die aufgereinigten Inclusion body-Pellets wurden in Solubilisierungspuffer gelöst und das Protein wurde aus diesem Puffer durch Verdünnung in PBS-Puffer zurückgefaltet (siehe Methodenteil Kapitel 4.3.3).

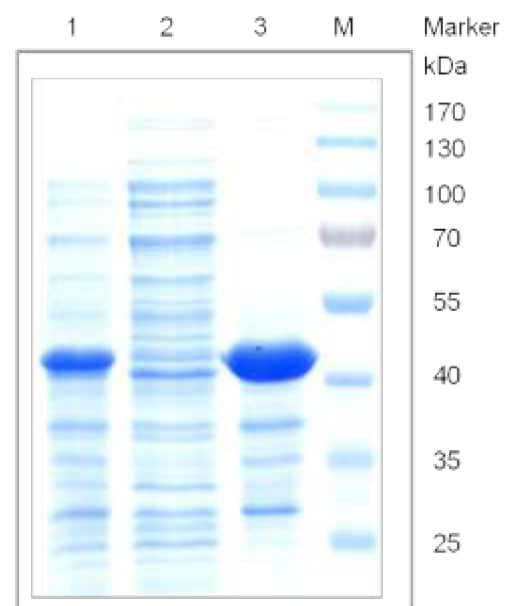


Abbildung 21: Untersuchung zum Löslichkeitsverhalten von ConA-SAv. Lane 1: Gesamtextrakt; Lane 2: löslicher Zellextrakt; Lane 3: unlöslicher Zellextrakt. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific

Die Reinheit des ConA-SAv Linkerproteins wurde mittels SDS-PAGE und Western blot bestimmt, wie in der Abbildung 22 zu sehen. Die Reinheit des Linkerproteins lag zwischen 80 und 90 Prozent und die molare Masse von ca. 43 kDa konnte ebenfalls bestätigt werden. Allerdings waren auch einige Unreinheiten auf der SDS-PAGE sowie dem Western blot zu erkennen. Diese lagen bei ca. 38, 35 und 27 kDa. Für den Western blot wurde ein anti-Streptavidin Antikörper verwendet. Da diese kleinen Fraktionen auf dem Western blot ebenfalls durch den Antikörper detektiert wurden, ließ sich folgern, dass diese Banden ebenfalls eine Streptavidin-Domäne besitzen mussten. Daher konnten diese Banden Fragmente oder Abbauprodukte des Linkerproteins darstellen. Die Ausbeute an Protein betrug insgesamt ca. 10 mg/l Zellkultur.

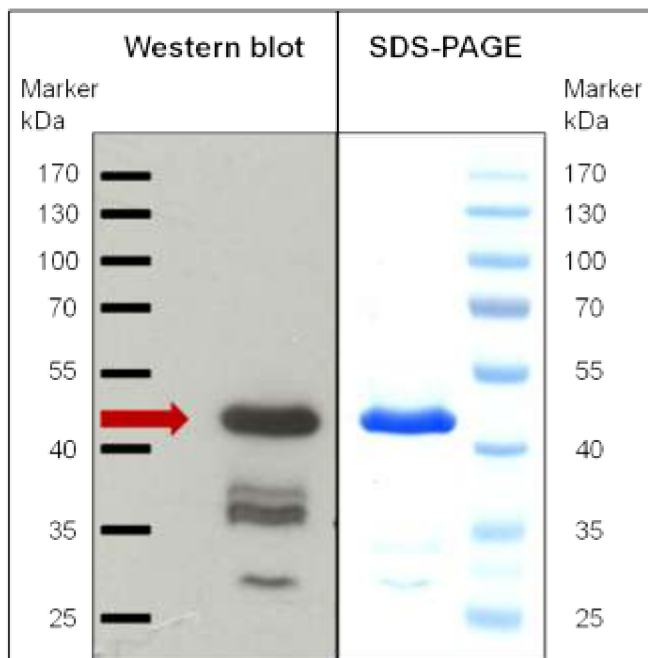


Abbildung 22: SDS-PAGE und Western Blot nach Inclusion body-Aufreinigung des ConA-SAv. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific

5.2.3 Assay Modell ConA-SAv

Zur Funktionstestung des ConA-SAv Linkerproteins wurde eine Co-Immunopräzipitation auf Dextran Oberfläche sowie Messungen auf mit Dextran und Mannan funktionalisierten Glas- und Goldoberflächen durchgeführt. Die Co-Immunopräzipitation wurde mittels SDS-PAGE ausgewertet und die mit Zucker präparierten Chips wurden mittels Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie untersucht. Die Goldprismen waren für die Oberflä-

chen Plasmon Resonanz verwendet worden. Ein Schema des Immunoassays basierend auf diesen Technologien, ist in Abbildung 23 zu sehen.

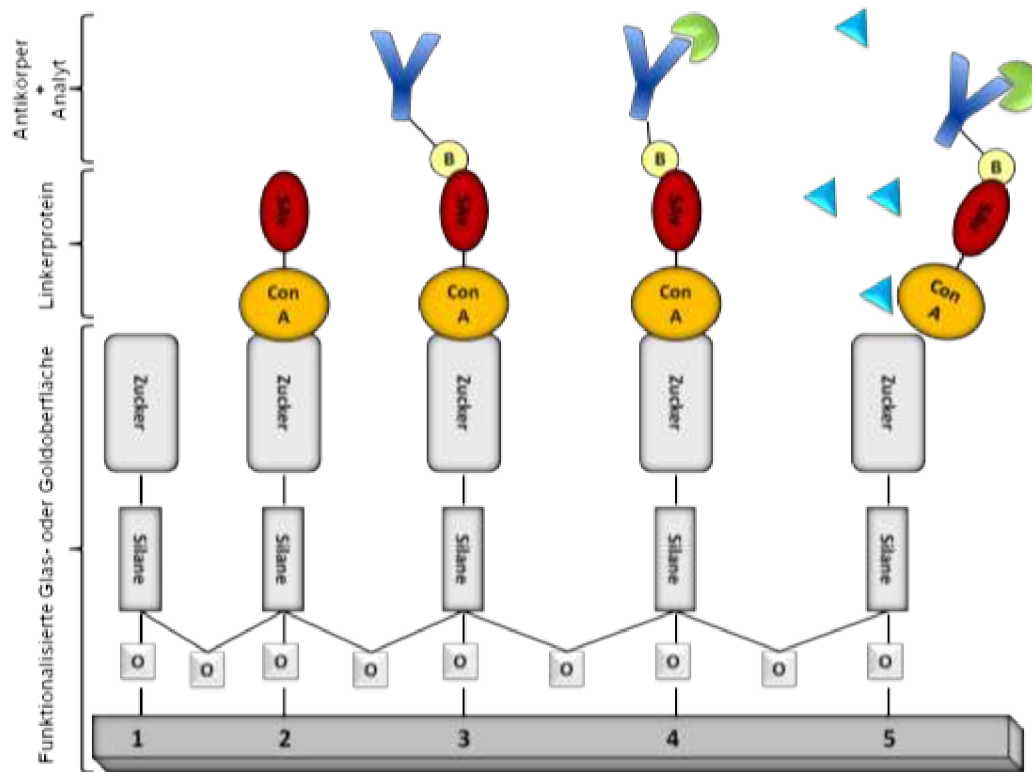


Abbildung 23: Konzept Assay ConA-SAv auf Zucker Oberfläche. Eine hydroxylierte Oberfläche wird so funktionalisiert, dass der Zucker (Mannan, Dextran etc.) auf der Oberfläche exponiert wird 1). Anschließend wird die Oberfläche mit dem ConA-Streptavidin Fusionsprotein 2) belegt. 3) An das Linkerprotein wird über Selbstorganisation ein biotinylierter Antikörper gebunden. 4) Aus einem relativ großen Probevolumen bindet nun der Analyt an den Antikörper. 5) Der Analyt wird gemeinsam mit dem Antikörper und dem Linkerprotein durch die Zugabe einer geringen Menge einer α -D-Methylmannopyranose-Lösung, eluiert. Anschließend liegt wieder die freie, mit Zucker funktionalisierte Oberfläche vor.

Eine hydroxylierte Oberfläche wird auf chemisch kovalentem Weg mit einem Zucker, z.B. Dextran oder Mannan, funktionalisiert (Schritt 1). Auf die mit Zucker funktionalisierte Oberfläche wird das Linkerprotein mittels der ConA-Domäne (Schritt 2) gebunden. Die biotinylierten Antikörper werden durch die SAv-Bindestelle auf dem Linkerprotein immobilisiert (Schritt 3), gefolgt von der Applikation des Analyten (Schritt 4). Nach der Detektion des Analyten, kann die mit Zucker funktionalisierte Oberfläche durch Waschen mit Puffer wieder regeneriert werden, der 10% (w/v) α -D-Methylmannopyranose (Schritt 5) enthält. Der Überschuss von α -D-Methylmannopyranose konkurriert an der Bindestelle

des ConA des Linkerproteins mit dem Dextran auf der Oberfläche und das Linkerprotein wird von der Oberfläche gelöst. Der gesamte Komplex aus Linkerprotein, Antikörper und Analyt werden von der Oberfläche gewaschen. Nach einem Spülschritt mit Puffer kann nun die Chipoberfläche theoretisch erneut mit ConA-SAv beladen werden.

5.2.4 Co-Immunopräzipitation

Der Co-Immunopräzipitations-Versuch (Co-IP) mit dem ConA-SAv Protein ist in der nachfolgenden Abbildung 24 dargestellt. Vor der eigentlichen Durchführung des Versuchs wurden Kontrollversuche durchgeführt, in denen gezeigt werden konnte, dass das BSA und der biotinylierte Antikörper nicht an die Sephadex[®] Matrix gebunden hat.

Bevor der eigentliche Assay gestartet wurde, wurden mögliche unspezifische Bindestellen, auf der Sephadex[®] Matrix, mit der BSA freien *Blocking Solution*[®] (BS) von Candor Bioscience blockiert (Anpassung der Blockierungsreagenzien: Kapitel 5.3). Danach wurde das Linkerprotein auf der Dextranoberfläche über die ConA-Bindedomäne immobilisiert. Die Analyse der korrespondierenden Waschschrte ist in der Abbildung 24 in den Reihen 1 bis 3 zu erkennen. Nachdem der biotinylierte Antikörper in der Co-IP inkubiert wurde, wurden die Waschschrte ebenfalls zur Analyse auf das Gel aufgetragen. Diese sind in den Reihen 5 bis 7 dargestellt. Nach dem dritten Waschschrte war im Überstand kein ungebundener Antikörper mehr zu erkennen. Daher sollte in diesem Schritt der biotinylierte Antikörper, welcher sich noch in der CO-IP befand, an die Streptavidin-Bindedomäne des Linkerproteins gebunden haben. Im nächsten Schritt wurde der Analyt BSA hinzugegeben. Die korrespondierenden drei Waschschrte wurden in den Reihen 8 bis 10 aufgetragen. Das BSA sollte nun an den im vorherigen Schritt biotinylierten anti-BSA Antikörper gebunden haben. Im Endergebnis sollte das Sandwich auf der Dextranoberfläche wie folgt aussehen: Sephadex[®] G-25 – ConA-SAv – biotinylierter anti-BSA Antikörper – BSA.

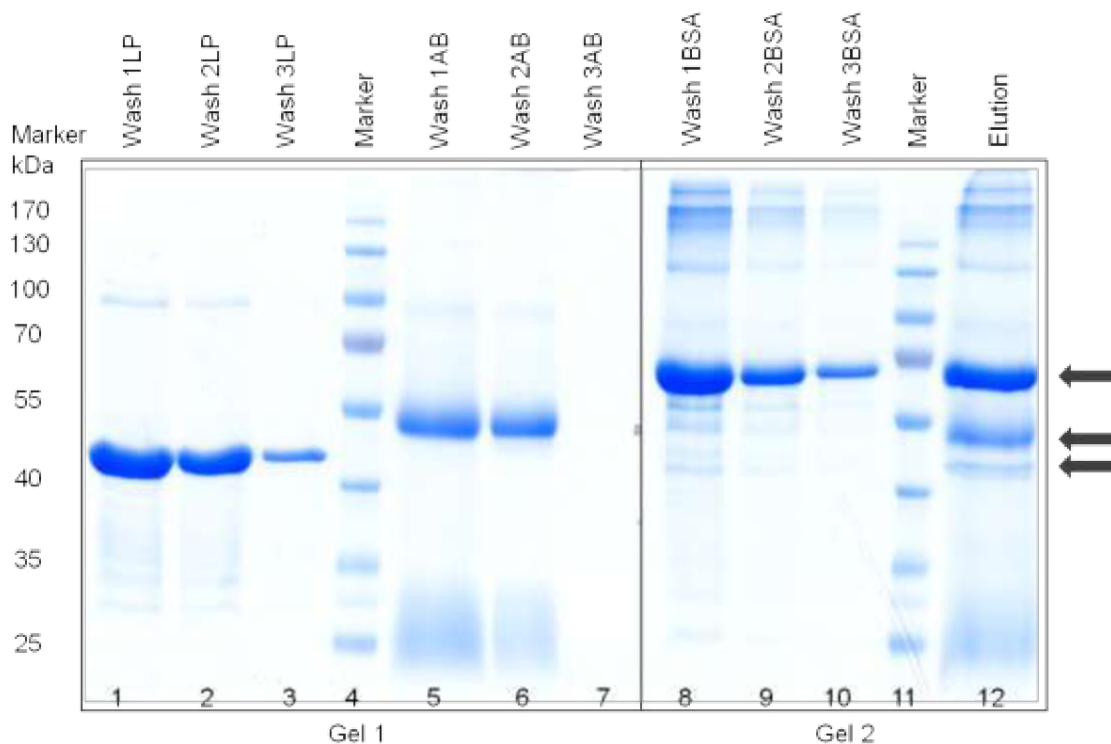


Abbildung 24: Co-Immunopräzipitation des ConA-SAv-Proteins. Auswertung des Pull-down Experiments auf 2 Gelen. Gel 1: Lane 1-3 Inkubation und Spülschritte des Linkerproteins, Lane 5-7 Inkubation und Spülschritte des biotinylierten Antikörpers; Gel 2: Lane 8-10 Inkubation und Spülschritte des Analyten BSA und Lane 10 Elution der Sephadex® G-25 Beads mit 10 % (w/v) α -D-Methylmannopyranose-Lösung. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific

In einem finalen Waschschrift sollte nun das Proteinsandwich von der Oberfläche der Sephadex® G-25 Beads abgelöst werden. Dies erfolgte mit 10 % (w/v) α -D-Methylmannopyranose-Lösung. Dieser Waschschrift wurde gefällt und in der Reihe 12 auf die SDS-PAGE aufgetragen. Wie erwartet waren alle Banden der Sandwichproteine in dieser Elution zu finden. Der untere Pfeil markiert das Fusionsprotein, der mittlere den biotinylierten Antikörper und der obere Pfeil das gebundene BSA.

Diese Resultate demonstrierten die volle Funktionalität und die reversible Bindeeigenschaft des ConA-SAv-Linkerproteins. Aufgrund der reversiblen Bindung konnte man folgern, dass das Protein spezifisch mit der ConA-Domäne an die Dextranmatrix gebunden hat, ohne dadurch die Streptavidin Bindestelle sterisch behindert zu haben. Die Streptavidin-Bindedomäne wiederum konnte erfolgreich den biotinylierten Antikörper binden, der wiederum, ohne einen Verlust seiner Funktionalität den Analyten, das BSA binden konnte. Zudem konnte die Dextran-ConA-Bindung erfolgreich durch den konkurrierenden Zu-

cker α -D-Methylmannopyranose gelöst werden. Die so regenerierten Sephadex[®] G-25-Beads hätten für eine weitere Analyse mit dem Linkerprotein nochmals beladen werden können.

5.2.5 Reflektometrische Interferenz Spektroskopie auf Dextranoberfläche

Die reversible Bindeeigenschaft des Linkerproteins ConA-SAv wurden zudem, mittels Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie untersucht (Abb. 25). Hierzu wurde eine mit Dextran funktionalisierter Glasoberfläche verwendet. Alle Schritte wurden mit einer Flussrate von 5 μ l/min, bei einer Temperatur von 21°C, durchgeführt. Das Experiment startete mit einer Äquilibrationsphase mit PBS-Puffer und anschließender Injektion von ConA-SAv (50 μ g/ml) bei 1500 sec. Die Assoziationsphase der ConA-Bindedomäne dauerte 600 sec und wurde gefolgt von einem Waschschrift mit PBS-Puffer. Nach einer Dissoziationsphase von 2500 sec wurde ein Signal von 200 IU (schwarze Kurve) bzw. 186 IU (graue Kurve) gemessen. Im nächsten Schritt wurde die Oberfläche mittels einer Injektion von 10 % (w/v) α -D-Methylmannopyranose in PBS-Puffer regeneriert. Die Regeneration dauerte 1800 sec und endete in einem Signal von 20 IU. Das bedeutet, dass das Linkerprotein beinahe vollständig von der Oberfläche abgelöst wurde. Im zweiten Teil des Experiments wurde ebenfalls wieder das Linkerprotein (50 μ g/ml) geladen und mit 10 % (w/v) α -D-Methylmannopyranose regeneriert, wie im ersten Teil. Auch im zweiten Teil zeigte sich eine Anbindung des Linkerproteins von 195 IU (schwarze Kurve), bzw. 189 IU (graue Kurve) sowie ein verbleibendes Signal von 21 IU (schwarze Kurve), bzw. 30 IU (graue Kurve) nach der Regeneration, was wiederum eine sehr gute Regeneration der Chipoberfläche vermuten ließ. Eine exakt eindeutige 100%ige Regeneration ließ sich hier leider nicht nachweisen, durch einen Drift der Basislinie des Sensorsignals, nach den jeweiligen Spülschritten mit α -D-Methylmannopyranose-Lösung.

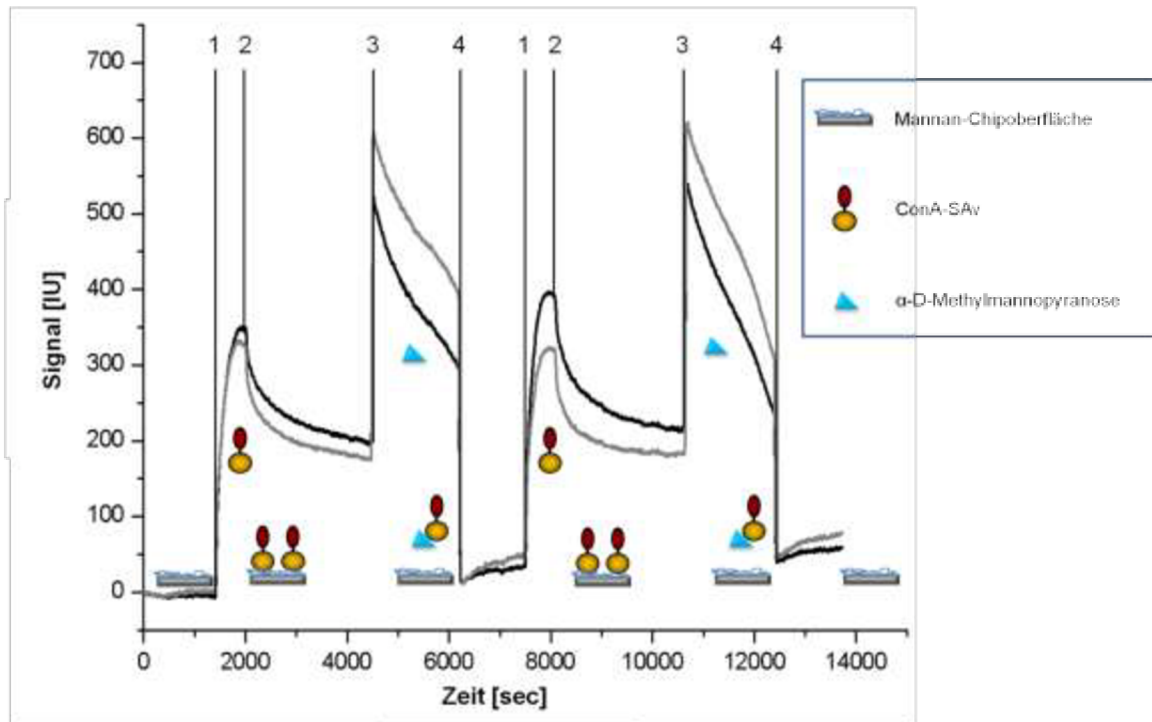


Abbildung 25: RIAS-Sensorgramm. Regeneration von ConA-SAV auf einer mit Dextran funktionalisierten Glasoberfläche. 1: Injektion des ConA-SAV, 2: Dissoziationsphase in PBS-Puffer, 3: Injektion der 10 % α -D-Methylmannopyranose-Lösung, 4: Spülschritt mit PBS-Puffer.

Um nun die Funktionalität der Streptavidin-Bindedomäne zu untersuchen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt (Abb. 26). Eine mit Dextran funktionalisierte Glasoberfläche wurde zuerst mit der BS behandelt, um Bereiche der Chipoberfläche zu blockieren, die nicht mit Dextran funktionalisiert worden waren. Nach diesem Blockierungsschritt wurde nach 1650 sec das Linkerprotein injiziert. Man erkannte eine deutliche Anbindung des ConA-SAV-Proteins an die Dextranoberfläche. Nach einem Spülschritt mit PBS-Puffer wurde der biotinylierte Antikörper appliziert. In diesem Experiment wurde ein biotinylierter anti-BSA-Antikörper verwendet. In vorherigen Kontrollexperimenten wurde keine Anbindung von diesem Antikörper sowie des Analyten BSA, an die BS detektiert. Nach einem erneuten Spülschritt von PBS-Puffer wurde der Analyt BSA injiziert. Man konnte eine erfolgreiche Anbindung des Analyten, an den Antikörper, an die Oberfläche beobachten. Im Anschluss wurde 20%ige α -D-Methylmannopyranose-Lösung appliziert. Nach dem letzten Spülschritt mit PBS-Puffer war keine Regeneration der Oberfläche sichtbar (Abb. 26). Das Signal verblieb auf dem gleichen Level wie vor dem Regenerati-

onsschritt mit α -D-Methylmannopyranose-Lösung, in der Zeichnung gekennzeichnet durch die rote Linie.

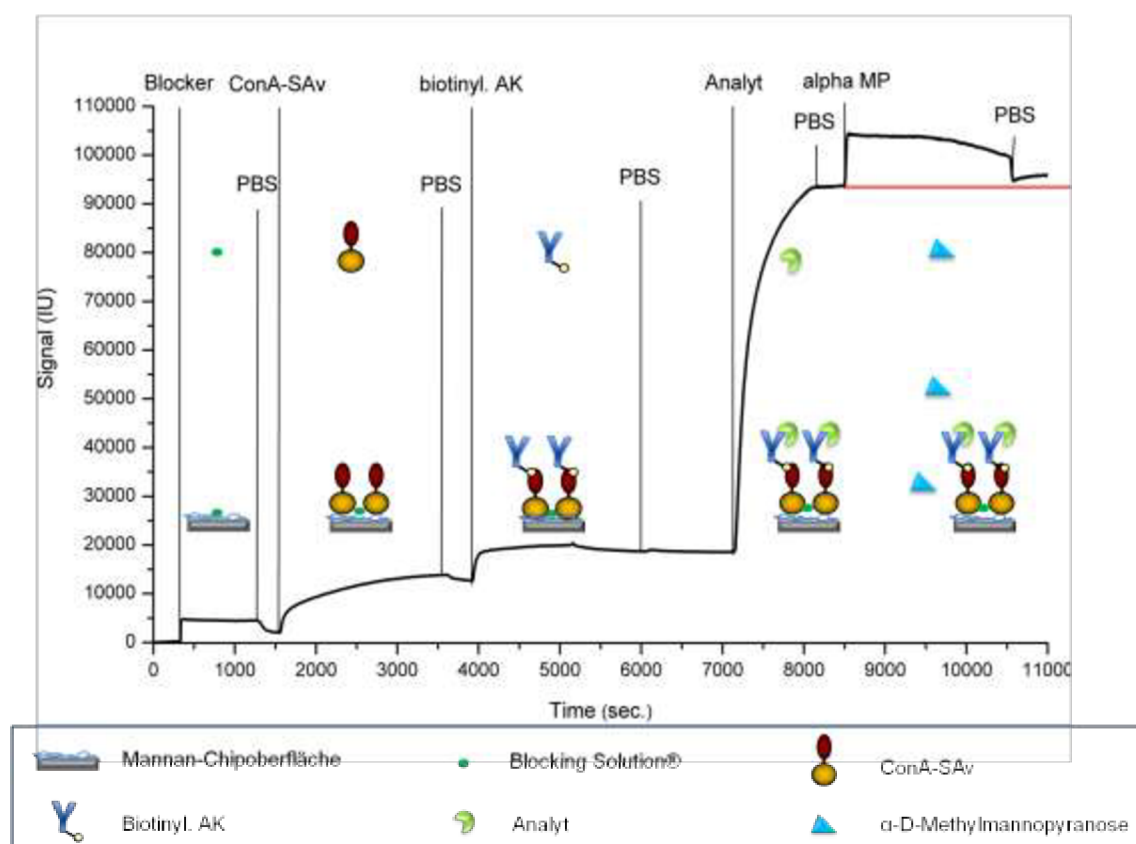


Abbildung 26: RIFS-Sensorgramm von ConA-SAv auf einer mit Dextran funktionalisierten Glasoberfläche. Zuerst erfolgte die Blockierung der Vakanzen in der Dextranoberfläche mittels BS, anschließend die Applikation des Linkerproteins ConA-SAv. An das Linkerprotein wurde der biotinylierte Antikörper gebunden und darauf der Analyt BSA. Zuletzt erfolgte ein Waschschriff mit 20%iger α -D-Methylmannopyranose-Lösung.

Wie das obige Sensorgramm erkennen lässt, war der Assay sehr gut geeignet, einen spezifischen Analyten, vermittelt durch das Linkerprotein, inklusive Antikörper zu detektieren. Diese Beobachtung ließ den Schluss zu, dass beide Domänen des Linkerproteins funktional waren. Da sich dennoch auf der RIFS-Plattform unter diesen Assay Bedingungen, auch nach weiteren Versuchen, keine Regeneration nach Applikation von biotinylierten Antikörpern und Analyt hervorrufen lassen konnte, wurde entschieden, dass Assay System auf der SPR-Plattform vergleichend zu testen. Diese Experimente sind im nächsten Kapitel erläutert.

5.2.6 Surface Plasmon Resonance auf Mannanoberfläche

Zur weiteren Untersuchung der Regenerierbarkeit wurden Experimente mittels SPR durchgeführt. Hierzu wurde das Gerät der Firma Plasmonic verwendet. Dieses bietet, im Gegensatz zur RfS-Methode den Vorteil, dass es sich um ein Küvetten-System handelt. Innerhalb dieser Küvetten können die Parameter der Spülschritte, deren Dauer und Intensität besser variiert werden, als im Durchflusssystem des RfS. Vor dem Experiment wurde die Goldoberfläche mittels Oberflächenchemie mit Mannan beschichtet. Der Versuchsaufbau war ähnlich wie im vorherigen Kapitel. Die Oberfläche wurde zuerst mittels BS behandelt, um eventuelle Vakanzen abzudecken (Abb. 27). Danach erfolgte die Applikation des Linkerproteins ConA-SAv. Die Signalstärken der Anbindungen konnten zwischen RfS und SPR leider nicht direkt verglichen werden, da es sich um eine andere Einheit handelt. Im Fall des SPR konnte nach Applikation des Linkerproteins eine Nettoanbindung von 15 Pixeln veranschlagt werden. Die nachfolgende Anbindung des biotinylierten Antikörpers ergab ein Nettosignal von 57 Pixeln. Die Applikation eines Analyten wurde ausgesetzt, da zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar war, welche Auswirkung der Analyt auf die Regenerationsfähigkeit der Oberfläche hatte. Somit wurde nun versucht den Komplex aus Linkerprotein und biotinylierten Antikörper, mittels α -D-Methylmannopyranose zu lösen. Wie aus dem Sensorgramm ersichtlich wird, konnte der Komplex nicht von der Oberfläche gelöst werden. Es konnte nur eine Verringerung des Signals um 4 Pixel registriert werden.

Somit stellte sich, nicht nur in diesem Experiment, sondern auch in vielen weiteren heraus, dass das Linkerprotein, sobald es einen biotinylierten Antikörper gebunden hatte, nicht mehr von der Oberfläche gelöst werden konnte. Es wurden verschiedene Abfolgen von Spülschritten sowie Inkubationszeiten der Regenerationslösung getestet, jedoch immer mit dem gleichen Ergebnis. Eine Regeneration der Oberfläche war unter diesen Umständen nicht möglich.

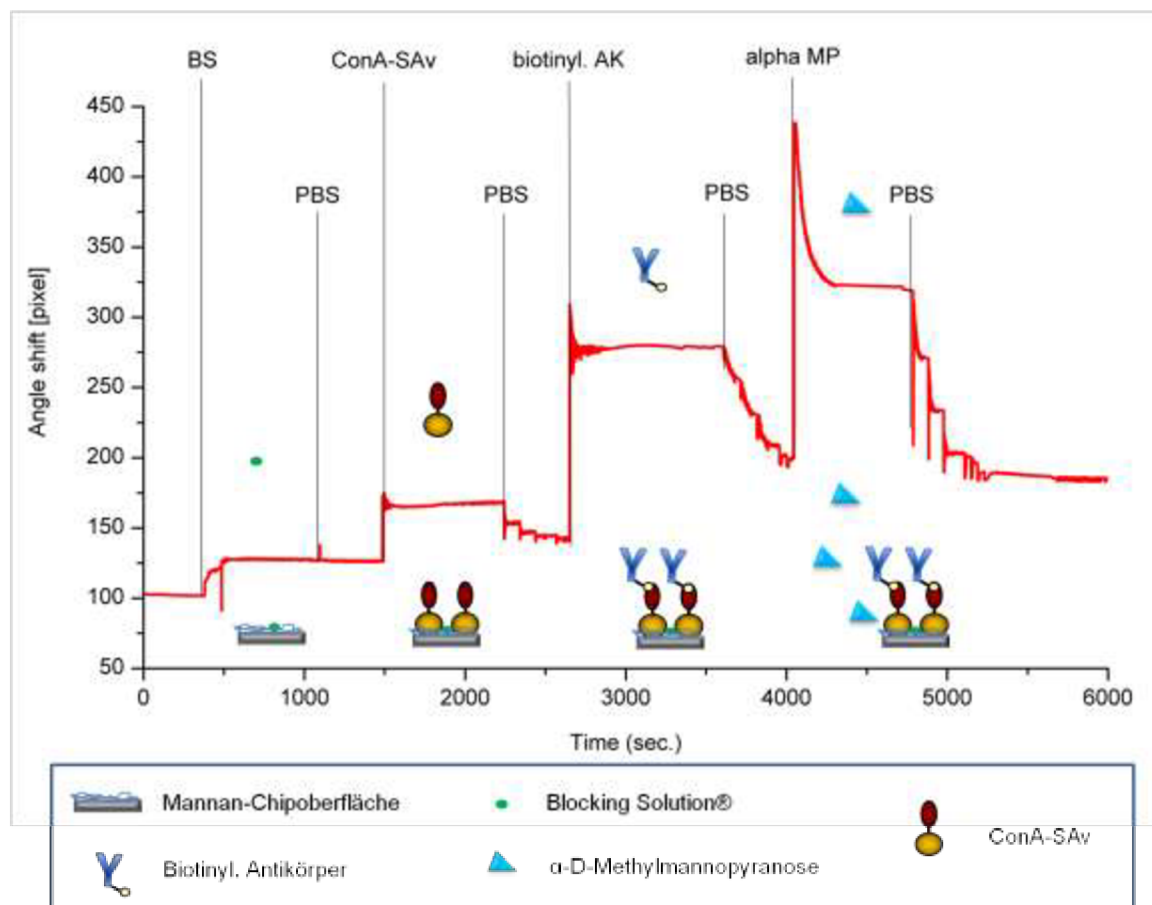


Abbildung 27: SPR-Sensorgramm von ConA-SAv auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche. Zuerst erfolgt die Blockierung der Vakanzen auf der Oberfläche mittels BS, anschließend Applikation des Linkerproteins ConA-SAv. Auf das Linkerprotein wurde der biotinylierte Antikörper gebunden. Zuletzt erfolgt ein Waschschrift mit 20%iger α -D-Methylmannopyranose-Lösung.

Um ausschließen zu können, dass das Linkerprotein irreversibel an die Blockierungslösung BS gebunden haben könnte, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Dieses ist in Abbildung 28 dargestellt. Eine C-18-funktionalisierte Goldoberfläche wurde mit BS gesättigt und im Anschluss wurde das Linkerprotein appliziert. Nach Signalanstieg durch Anbindung der BS auf 216 Pixel, erfolgte die Applikation des ConA-SAv. Zuerst war ein Signalanstieg auf über 300 Pixel zu beobachten. Dieser wurde durch den erhöhten Brechungsindex der Proteinlösung verursacht. Nach Spülung mit PBS-Puffer wurde das ungebundene Linkerprotein vollständig von der Oberfläche gewaschen. Das Signal fiel auf das Anfangssignal nach Anbindung der BS auf 216 Pixel. Somit war eine Interaktion zwischen BS und ConA-SAv auszuschließen.

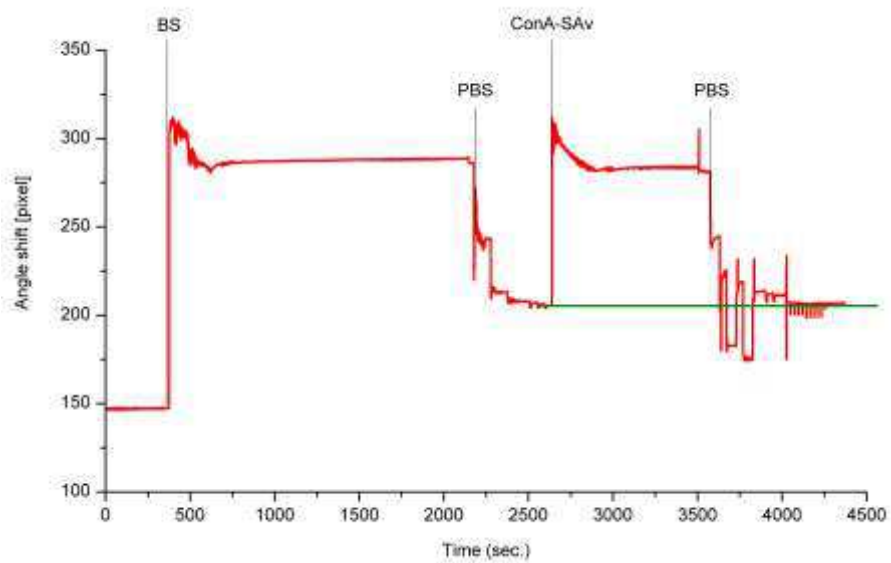


Abbildung 28: SPR-Sensorgramm Kontrollexperiment von ConA-SAv auf einer C-18-funktionalisierten Goldoberfläche. Zuerst erfolgte die Immobilisierung von BS an die C-18-Oberfläche und im Anschluss die Applikation des Linkerproteins ConA-SAv.

5.2.7 Weiterführende Versuche zur Regenerationsfähigkeit

Im weiteren Verlauf sollte eine Optimierung der Assay-Bedingungen, für die Regeneration an planaren Oberflächen, erfolgen. Hierunter fallen zum Beispiel Veränderungen im Bereich des pH-Wertes, dem Einsatz von Detergenzien und ähnlichen Ansätzen. Die folgende Abbildung 29 zeigt eine Zusammenstellung mehrerer Ansätze, durchgeführt mit RfS in einem Diagramm. Bei allen Experimenten erfolgte zuerst die Anbindung des Linkerproteins ConA-SAv an die Mannanoberfläche. Nach einem Spülschritt mit PBS-Puffer wurde der biotinylierte Antikörper anti-BSA appliziert. Nach einem erneuten Spülschritt mit PBS-Puffer erfolgte nun die Regeneration. Hierbei wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Das rote Sensorgramm in Abbildung 29 zeigt die Verwendung von α -D-Methylmannopyranose mit einem pH von 6. Dieser Ansatz ging auf die Eigenschaften des ConA zurück.

Das native ConA kann bei unterschiedlichen pH-Werten auch unterschiedliche Verhaltensweisen in der Bildung von Homo- oder Tetrameren zeigen. Diese Eigenschaft wurde bereits in Kapitel 1.2.1 angesprochen. Je niedriger der pH-Wert des umgebenden Mediums ist, desto weniger erfolgt eine Anbindung der ConA Moleküle untereinander. Diese Eigenschaft ist zwar auf das native ConA bezogen, allerdings sollte durch diesen Ansatz

auch experimentell ausgeschlossen werden, dass das verwendete pre-pro-ConA keine Homo- oder Tetramere bildet, wie laut Min et al., 1992 beschrieben.

Das grüne und blaue Sensorgramm zeigt den Verlauf mit 2% Tween 20 (v/v) in der α -D-Methylmannopyranose-Lösung. Zudem wurde in diesen Experimenten, trotz des positiven Verlaufs des Kontrollexperiments im vorherigen Kapitel (Abb. 28), auf den Einsatz des Blockierungsreagenz verzichtet, um einen eventuellen negativen Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit auszuschließen.

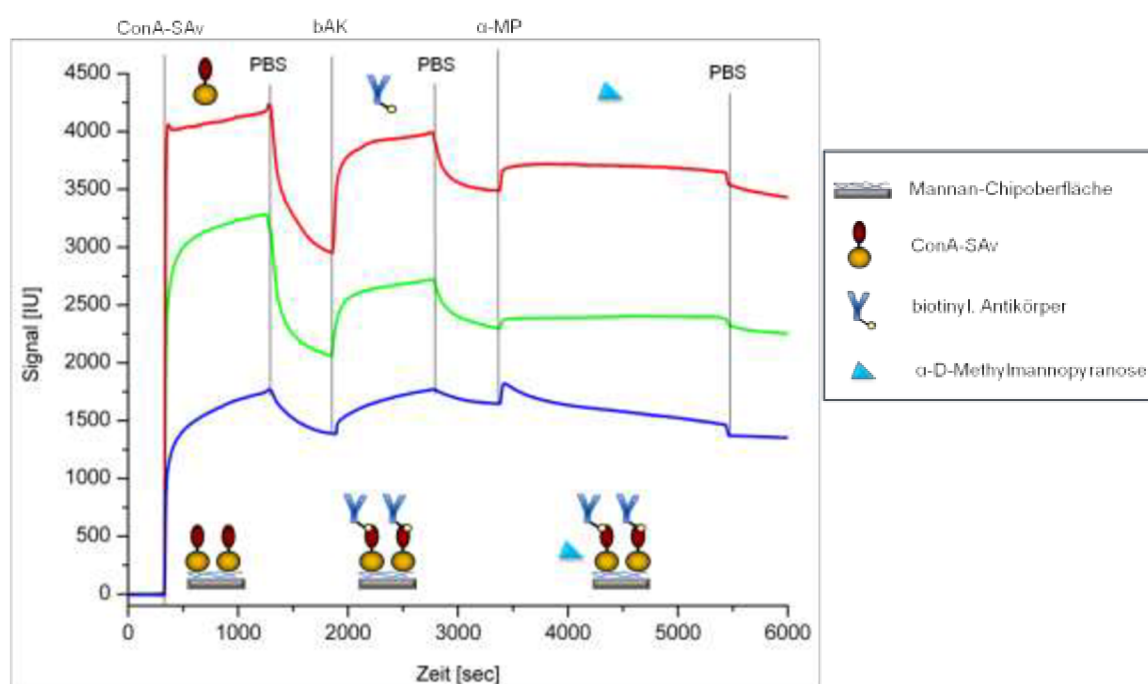


Abbildung 29: RfS-Sensorgramme Zusammenfassung Regenerationsexperimente. Zuerst erfolgt die Applikation des ConA-SAv auf die Mannanoberfläche. Im Anschluss wird der biotinylierte Antikörper (anti-BSA) appliziert. Im dritten Schritt findet die Regeneration mit α -D-Methylmannopyranose statt. Hierbei sind unterschiedliche Ansätze verfolgt worden: Rot: α -D-Methylmannopyranose mit einem pH von 6; grün und blau: α -D-Methylmannopyranose mit Zusatz von 2% Tween 20 (v/v).

Bei Verwendung einer α -D-Methylmannopyranose-Lösung mit einem pH von 6 (Abb. 28, rotes Sensorgramm) zeigte sich nach Applikation dieser Lösung keine konkrete Regeneration der Oberfläche. Der anfängliche Wert von 3497 IU, nach Anbindung des biotinylierten Antikörpers, wurde nach der Regeneration ebenfalls wieder erreicht. Das Sensorsignal zeigte im weiteren Verlauf eine Tendenz nach unten, wobei diese nicht sehr stark ausfiel.

Das grüne und blaue Sensorgramm in Abbildung 29 zeigt jeweils unabhängige Experimente bei Verwendung von α -D-Methylmannopyranose, mit Zusatz von 2% Tween 20 (v/v). Im blauen Sensorgramm war nach Anbindung des biotinylierten Antikörpers ein Signal von 1632 IU zu verzeichnen. Bei Applikation der α -D-Methylmannopyranose mit Zusatz von 2% Tween 20 (v/v) fiel das Signal, nach Beendigung des Regenerationsschrittes, auf 1352 IU. Dieses Ergebnis war sehr vielversprechend und wurde aus diesem Grund wiederholt. Die Wiederholung ist im grünen Sensorgramm zu sehen. Das Ergebnis konnte nicht reproduziert werden. Nach dem Regenerationsschritt fiel das Signal auf 2249 IU, welches dem Ausgangswert, der Anbindung des biotinylierten Antikörpers von 2363 IU, sehr nahe kam.

Dieses ungeklärte Phänomen, die fehlende Regenerierbarkeit nach Applikation eines biotinylierten Antikörpers, führte im Anschluss zu den Arbeiten, in denen Mutationen innerhalb der ConA-Domäne durchgeführt wurden. Diese Mutationen sollten die Bindeeigenschaften der ConA-Domäne an die Zuckeroberfläche beeinflussen und wenn möglich eine leichtere Regeneration der Oberfläche hervorrufen. Zudem war die schlechte Regenerationsfähigkeit ein zunächst verwunderliches Ergebnis, da die Co-Immuno-präzipitation erfolgreich verlaufen war.

5.2.8 Mutagenese von ConA-SAv

Im Zuge dieser Arbeiten wurden verschiedene Mutagenese-Ansätze verfolgt, um die Binde-domäne des ConA Teils innerhalb der Linkerproteine zu modifizieren. Dies sollte eine Modifikation der Bindeeigenschaften hervorrufen. Zu diesem Zweck wurde das „Quick-Change[®] Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Agilent Technologies (Canada) verwendet. Es erlaubte die Insertion, Deletion oder den Austausch einzelner Basen innerhalb eines Plasmids bei Verwendung von eigens dafür vorgesehenen Primern.

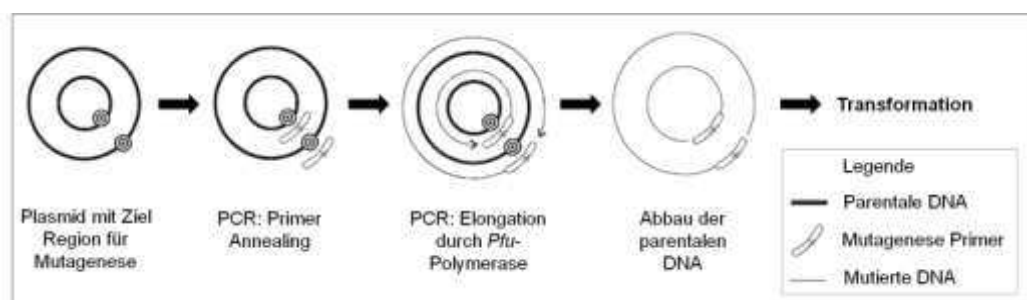


Abbildung 30: Überblick QuickChange[®] Site-Directed Mutagenese-Methode

Für die Methode wurde supercoiled Doppelstrang-DNA (dsDNA) verwendet. Im Vorfeld mussten zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotidprimer, mit der gewünschten Mutation, erzeugt werden. Diese Primer, welche jeweils komplementär zum entgegengesetzten DNA-Strang des Vektors waren, wurden während der PCR durch die *Pfu* Polymerase verlängert und so in die Gensequenz des Tochterstrangs inseriert. Nach erfolgter PCR wurde, durch den Einsatz des Enzyms *DpnI*, die parentale DNA abgebaut. Diese Endonuklease baute spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA ab, woraufhin man selektiv die synthetisierte DNA mit der Mutation erhielt. Diese DNA konnte nun in kompetente Zellen transformiert werden.

Um die Bindeeigenschaft des ConA Teils der Linkerproteine zu beeinflussen mussten zunächst die Bindestellen des ConA an den Zucker untersucht werden. Diese wurden durch Literaturrecherche ermittelt (Becker et al. 1974; Baetzing, Fiete 1978; Derewenda et al. 1989 und Yamauchi et al. 1989). Da für die Klonierung der Linkerproteine die precursor Form des ConA verwendet wurde, waren die Literaturangaben, bezogen auf die mature Form des Proteins, nur indirekt übertragbar. Da allerdings keine detaillierten Angaben über die precursor-Form existierten, mussten diese Hinweise genutzt werden. Da man wusste, dass die precursor-Form des ConA ebenfalls bindungsaktiv ist, konnten die ermittelten Positionen für den Sitz der Bindestellen übertragen werden, indem man die Positionen vor der Deglycosylierung und Umwandlung errechnete.

ConA besitzt 5 Aminosäuren (Positionen: 119, 138, 177, 262 und 263), die innerhalb der Bindetasche sitzen und direkt an der Bindung des Zuckers beteiligt sind. Zudem besitzt ConA, wie oben schon erwähnt, eine Metallbindestelle (Position 171-187), welche für die Struktur des Proteins essentiell ist sowie eine N-glykosylierte Aminosäure an Position 145. Die Bindung an den Interaktionspartner Zucker erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen. Die mature Form der ConA-Sequenz besteht aus den Resten 164-281, gefolgt von den Aminosäuren 30-148. Diese Umwandlung erfolgt nach der Abspaltung der Signalsequenz der ersten 29 AS. Sie wird hervorgerufen durch die Spaltung der Aminosäure Kette bei Asparagin an den Positionen 148, 163 und 281. Die erhaltenen Stücke ordnen sich neu an und die Peptidbrücken werden erneut gebildet, sodass die mature Form erhalten wird. Übertragen auf das precursor Konstrukt unseres Linkerproteins bedeutet dies: Die Positionen 90, 110, 147, 233 und 234 sind die Positionen der bindenden Aminosäuren und die Position 152 trägt die N-glykosylierte Aminosäure. Die Metallbindestelle befindet sich an Position 142-157.

Position	Aminosäure
90	Asparaginsäure
110	Arginin
147	Asparagin
233	Leucin
234	Tyrosin

Eine Mutagenese in der Metallbindestelle wurde nicht in Betracht gezogen, um die dreidimensionale Struktur des Proteins nicht zu sehr zu stören, wodurch Position 147 als Mutageneseort nicht in Frage kam. Als möglicher Mutageneseort wurde Position 90 in Betracht gezogen. Asparaginsäure (Asp/D) zählt zu den sauren Aminosäuren. Sie kommt natürlich als L-Form vor und wird durch den Triplet Code GAT und GAC codiert. Eine naheliegende Mutagenese war die Umformung in Asparagin (Asn/N). Dazu musste der Triplet Code GAT zu AAT ausgetauscht werden. Dadurch wurde der saure Charakter der Asparaginsäure genommen und durch eine neutrale, strukturell ähnliche Aminosäure ersetzt.

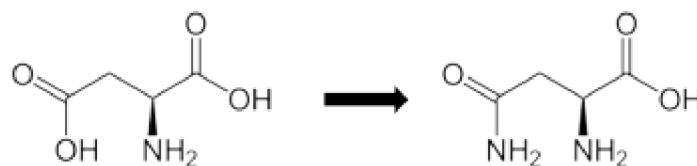


Abbildung 31: L-Asparaginsäure und L-Asparagin

Eine weitere Möglichkeit der Mutagenese bot sich an Position 110. Arginin (Arg/R) zählt, wie auch Lysin (Lys/K), zu den basischen Aminosäuren, wobei Arginin durch die Guanidingruppe mit einem pKs Wert von 12,1 stark basisch ist und Lysin mit seinen pKs Werten 2,2; 8,9 und 10,28 eine schwächere Base darstellt. Diese Umwandlung einer stark basischen Aminosäure zu einer schwach basischen Aminosäure ist durch den Austausch einer einzelnen Base von AGG zu AAG möglich.

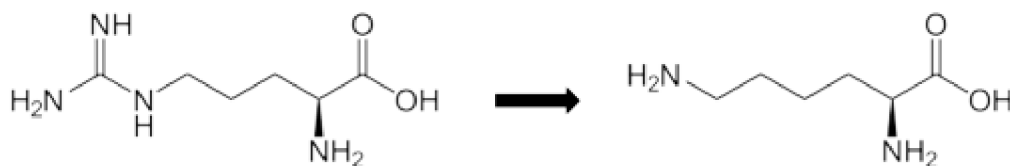


Abbildung 32: L-Arginin und L-Lysin

Eine Mutagenese der angrenzenden Aminosäuren wurde nicht in Betracht gezogen, da zur Berechnung der Auswirkungen auf die Struktur, ohne Grundlage eines dreidimensionalen Modells, keine Möglichkeit bestand. Dazu hätten umfassende Modelle berechnet werden müssen, was innerhalb dieser Arbeit leider nicht möglich war. Aus diesem Grund wurden nur diese beiden Ansätze weiter verfolgt.

Die Mutanten wurden, wie im Methodenteil Kapitel 4.1.4 beschrieben, mittels PCR hergestellt, durch Sequenzanalyse bestätigt und nach Transformation in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Protokoll des Ursprungsproteins ConA-SAv und wird aus diesem Grund nicht weiter aufgeführt.

5.2.8.1 Mutante D90N

Zuerst wurde die Mutante D90N hergestellt. In dieser Mutante wurde an Position 90 die Asparaginsäure zu Asparagin umgewandelt. Die genaue Beschreibung der Mutation ist in Kapitel 5.2.8 dargestellt.

Zur Funktionstestung des Linkerproteins D90N wurde eine mit Mannan funktionalisierte Goldoberfläche mittels SPR gemessen. Auf diese Oberfläche sollte eine Immobilisierung von D90N, mit anschließender Regeneration (Abb. 33) erfolgen. Nach Applikation von D90N zeigte sich keine Erhöhung des Nettosignals im Kurvenverlauf. Trotz nicht erfolgter Anbindung des Linkers an die Oberfläche, wurde der Regenerationsschritt mit 20%iger α -D-Methylmannopyranose-Lösung durchgeführt.

Um auszuschließen, dass die Mannanoberfläche fehlerhaft war, wurde eine Applikation des Linkerproteins ConA-SAv durchgeführt. Hier zeigte sich (Abb. 33), wie auch schon in vorherigen Experimenten bestätigt, eine konstante Anbindung von 15 Pixeln im Nettosignal. Nach erfolgreicher Anbindung des ConA-SAv Linkerproteins wurde der Regenerationsschritt mit α -D-Methylmannopyranose-Lösung durchgeführt. Es zeigte sich eine 100%ige Regeneration der Mannanoberfläche. In diesem Fall wurde auf die Applikation eines biotinylierten Antikörpers verzichtet, um die korrekte Beschichtung der Oberfläche mit Mannan zu bestätigen. Zudem konnte so die reversible Bindung der ConA-Teile in den verschiedenen Linkerproteinen vergleichend getestet werden.

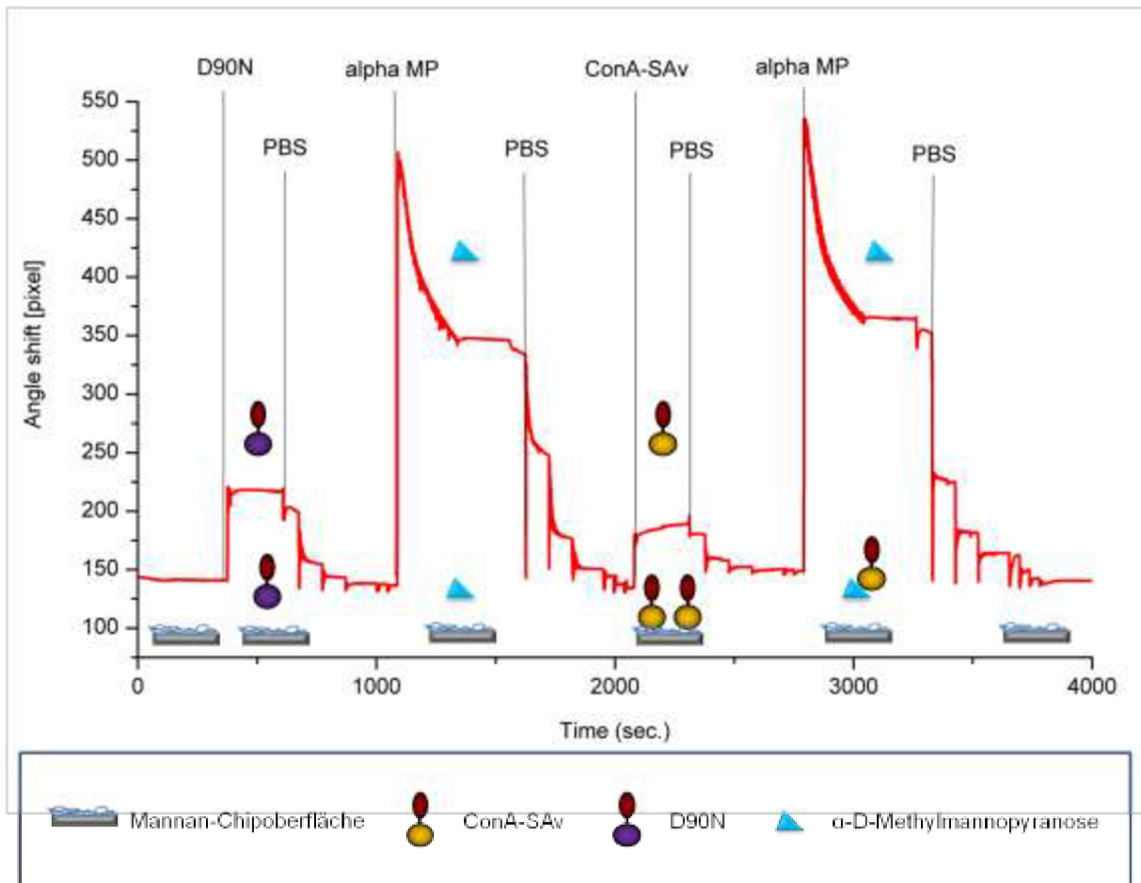


Abbildung 33: SPR-Sensorgramm von D90N und ConA-Sav auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche. Zuerst erfolgte die Anbindung der Mutante D90N mit anschließendem Regenerationsschritt mit α -D-Methylmannopyranose-Lösung. Danach wurde das Linkerprotein ConA-Sav appliziert mit anschließendem Regenerationsschritt mittels α -D-Methylmannopyranose-Lösung.

Dieses Experiment ist nur ein Beispiel für die vielen Experimente, die durchgeführt wurden, immer mit demselben Ergebnis. Das Linkerprotein D90N ließ sich nicht auf einer mit Zucker funktionalisierten Oberfläche immobilisieren geschweige denn, mittels Regenerationslösung von der Oberfläche wieder ablösen. Dies deutete auf einen absoluten Funktionsverlust des Proteins hin.

5.2.8.2 Mutante R110K

Im Laufe der weiteren Arbeiten wurde die Mutante R110K hergestellt. In dieser Mutante wurde an Position 110 Arginin zu Lysin umgewandelt. Die genaue Beschreibung der Mutation in Kapitel 5.2.8 dargestellt.

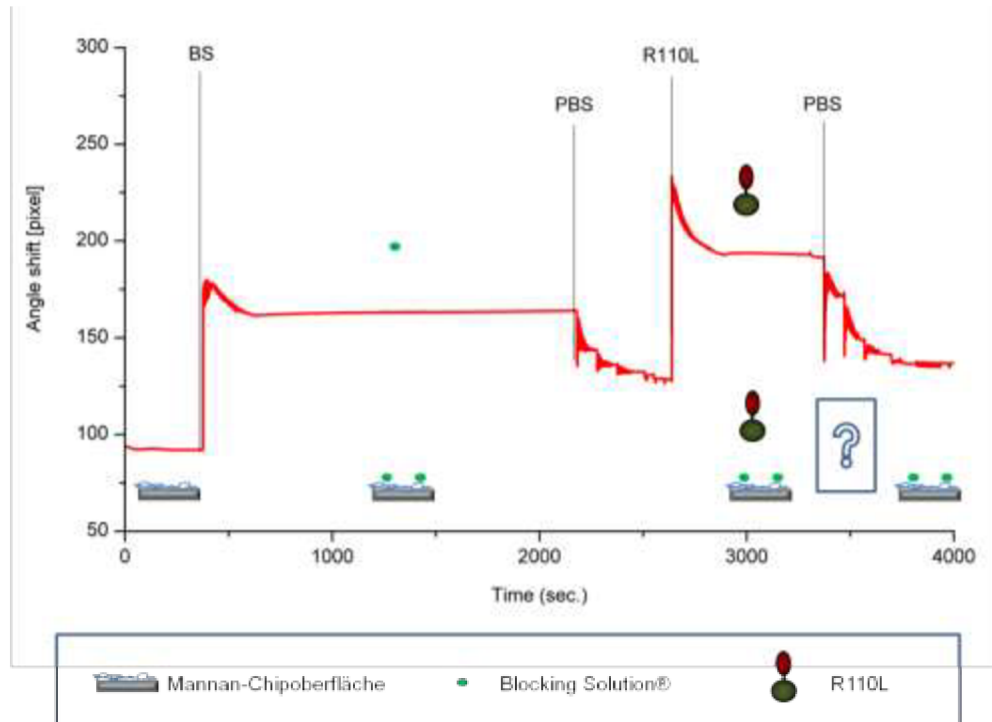


Abbildung 34: SPR-Sensorgramm von R110K auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche. Zuerst fand die Applikation der BS statt, anschließend wurde das Linkerprotein R110K zugegeben.

Die Funktionstestung der Mutante R110K wurde auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche durchgeführt (siehe Abb.34). Hierzu wurde die Oberfläche zuerst mit BS behandelt. Im Anschluss erfolgte die Applikation des Linkerproteins R110K. In diesem sowie in weiteren Experimenten, ließ sich aufgrund eines Anstiegs von durchschnittlich 4 Pixeln netto, keine signifikante Erhöhung des Signals nach Applikation der Mutante feststellen. Auch hier schien es zu einem Funktionsverlust der Zuckerbindedomäne gekommen zu sein.

Aufgrund der vielen Unwägbarkeiten, die die Mutagenese mit sich brachte, wurden die Arbeiten an den mutierten Linkerproteinen zurückgestellt, zugunsten anderer vielversprechender Projekte.

5.3 Anpassung der Blockierungsreagenzien an die Serum-Matrix

Da Serum eine komplexe Matrix mit vielen Interaktionspunkten darstellte, war es notwendig, das Blockierungsreagenz anzupassen. Es fiel auf, dass BSA auf den planaren sowie auf den 3D Strukturen eine unspezifische Interaktion mit dem Serum einging. Als Al-

ternative wurde die BS (*Blocking Solution*[®]) ausgewählt. Diese Blockierung ist auf Casein-Basis hergestellt und schien keinerlei unspezifische Interaktionen mit dem Serum einzugehen. Um das zu überprüfen wurde ein Kontrollexperiment (Abb. 35) durchgeführt, in dem auf eine mit Mannan funktionalisierte Goldoberfläche die BS als Blockierung eingesetzt wurde, um anschließend Serum zu applizieren. Die BS zeigte ein Netto-Signal von 158 Pixeln. Wie in der unten stehenden Abbildung zu sehen, zeigte das SPR Signal nach Applikation von Serum zuerst einen Anstieg im Signal auf 248 Pixel, sank aber nach der Dissoziationsphase wieder auf 159 Pixel. Der Anstieg des Signals bei Applikation von Serum ließ sich durch den hohen Brechungsindex der Lösung erklären. Nach Durchführung der Waschschriffe sank das Signal wieder auf den Ursprungswert von 158 Pixeln, wie nach der Applikation von BS und bildete im Anschluss wieder eine stabile Basislinie.

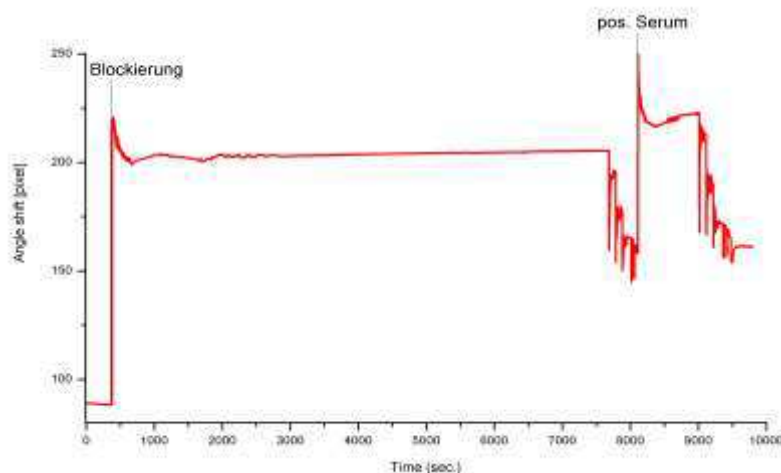


Abbildung 35: SPR-Sensorgramm. Kontrollexperiment: Mannanoberfläche mit Blockierungsreagenz mit anschließender Applikation von anti-OspC positivem Serum (Hd3 Vollbildserum).

Zudem zeigte sich, wie im unten dargestellten Kontrollexperiment, eine sehr hohe unspezifische Anbindung von BSA an das Fusionsprotein ConA-ProtA. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt. Daher war auch aus diesem Aspekt die Verwendung von BSA alle anderen durchgeführten Experimente unmöglich. Daher wurde für alle in dieser Arbeit dargestellten Experimente die BS von Candor Bioscience verwendet.

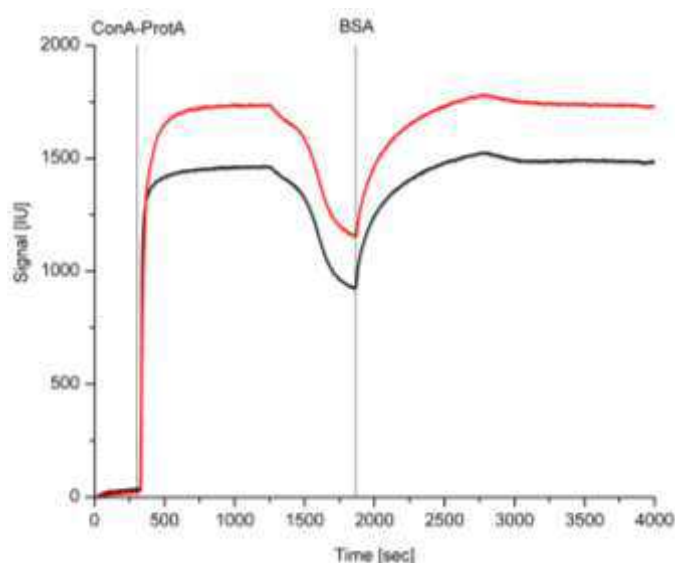


Abbildung 36: RfS-Sensorgramm. Kontrollexperiment: C-18-Oberfläche mit ConA-ProtA und anschließender Applikation von BSA.

5.4 Immunologische Detektion von Borreliose im Blutserum mittels ConA-OspC

ConA-OspC stellte eines der beiden Fusionsproteine dar, die während der Arbeit zur Detektion von Borreliose im Blutserum entwickelt wurden. Hierdurch sollte die Detektion spezifischer Antikörper aus dem Blutserum ermöglicht werden, die durch die körpereigene Immunabwehr infolge der Borreliose-Infektion gebildet werden.

5.4.1 Klonierungsstrategie, Gensequenzen, Restriktionsanalysen ConA-OspC

Das Gen des Outer Surface Protein C (OspC) wurde in Volllänge C-terminal mit einer kurzen Linkersequenz an die cDNA-Sequenz des pre-pro-ConA kloniert. Im Fall dieses Fusionsproteins wurde ein flexibler Linker verwendet.

Flexible Linker finden Verwendung, wenn die fusionierten Domänen eine gewisse Bewegungsfreiheit oder Interaktion benötigen. Sie bestehen aus kleinen, nicht polaren (z.B. Gly) oder polaren (z.B. Ser oder Thr) Aminosäuren, basierend auf den Ergebnissen von Argos (1990). Die geringe Größe der Aminosäuren fördert die Flexibilität und erlaubt eine größere Bewegungsfreiheit der Domänen. Der Gehalt an Ser und Thr kann die Stabilität der Linker in wässriger Lösung, durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen, verbessern und dadurch auch eine Reduktion von unvorteilhaften Interaktionen zwischen Linker und den Proteindomänen hervorrufen (Chen, Zaro, Shen 2013).

Die meist verwendeten flexiblen Linker besitzen eine Sequenz, vorrangig bestehend aus Abfolgen von Gly und Ser Resten ("GS"-Linker). Ein Beispiel hierfür ist der sehr oft verwendete GS-Linker mit der Abfolge: (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n, wobei durch die Anpassung der Anzahl n, die Länge des Linkers optimiert werden kann. Im vorliegenden Fall wurde eine Anzahl von drei Abfolgen gewählt.

Das OspC Gen aus *Borrelia afzelii* Stamm pKo wurde ermittelt, da *B. afzelii* die meist verbreitete Form darstellt und eine Infektion mit *B. afzelii* wesentlich wahrscheinlicher ist, als mit *B. garinii*. Als Endvektor wurde der pET-15b Vektor verwendet, bestimmt zur Expression im *E. coli* Stamm BL21 (DE3). Nach Proteinexpression sollte sich ein Protein, bestehend aus ConA mit 263 Aminosäuren, dem OspC Teil mit 220 Aminosäuren und dem kurzen Linker mit 15 Aminosäuren ergeben. Insgesamt resultiert daraus ein Protein von 56kDa.

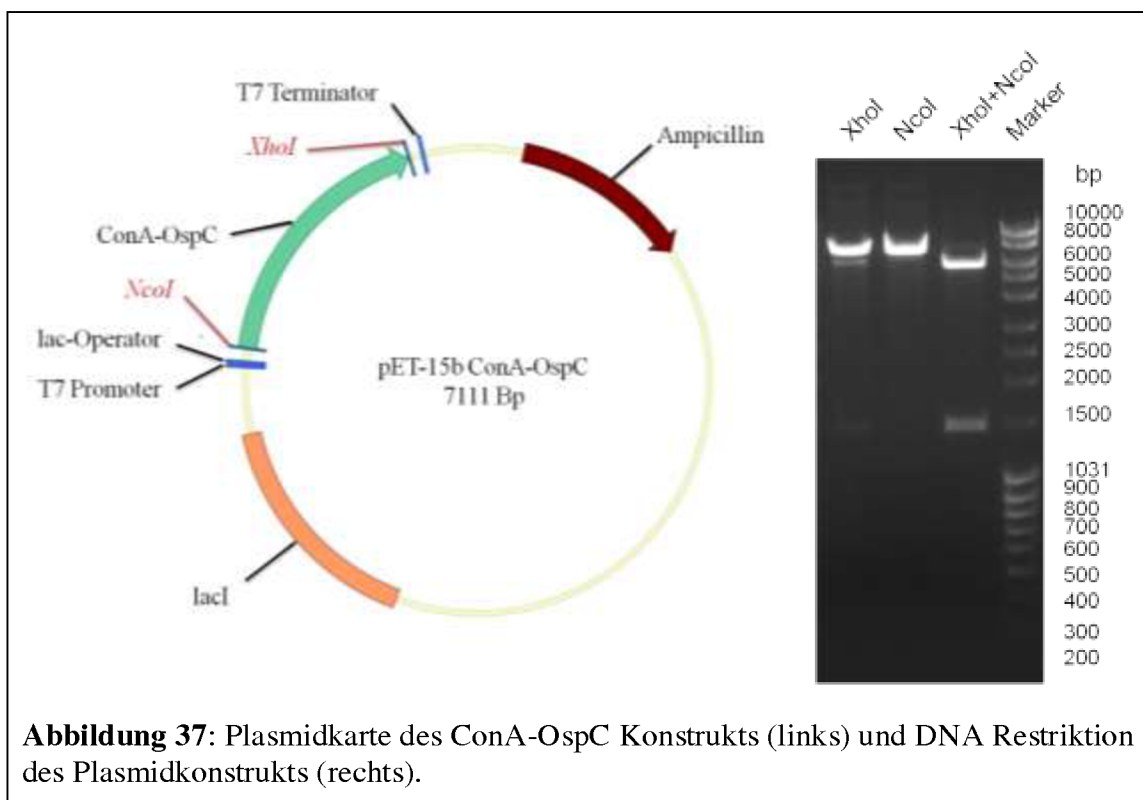


Abbildung 37 zeigt die Plasmidkarte des genetischen Konstrukts. Durch den pET-15b Vektor ist die Proteinexpression mittels IPTG-Zugabe induzierbar. Auf der rechten Seite der Abbildung ist eine Restriktionsanalyse des Plasmids zu sehen. Das Plasmid hatte eine Gesamtgröße von 7111 Basenpaaren. Nach der Restriktion mit den beiden Enzymen *XhoI* und *NcoI* erhielt man 2 Fragmente. Ein Vektorfragment mit 5666 Basenpaaren und ein

Insertfragment mit 1445 Basenpaaren. Auf ein Aufreinigungs-Tag wurde verzichtet. In vorheriger Literaturrecherche sowie aus eigener Erfahrung konnte man erahnen, dass das Protein aufgrund der ConA-Domäne, während der Expression in Inclusion bodies, abgeschieden würde. Um die Rückfaltung des Proteins so gering wie möglich negativ zu beeinflussen, wurden nur die wichtigsten Komponenten im Genkonstrukt berücksichtigt.

5.4.2 Expressionskinetik und Proteinaufreinigung von ConA-OspC

Es wurde eine Expressionskinetik über 12 h durchgeführt, um den richtigen Zeitpunkt für die Zellernte zu ermitteln. Die Zellen wurden in 250 ml flüssigem LB Medium auf eine optische Dichte von 0,8 angezogen und mit IPTG die Proteinexpression induziert. Im Folgenden wurde anfangs jede Stunde eine Probe entnommen und mit fortschreitender Zeit alle 2 bis 4 Stunden. Die Proben wurden aufgearbeitet und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 38).

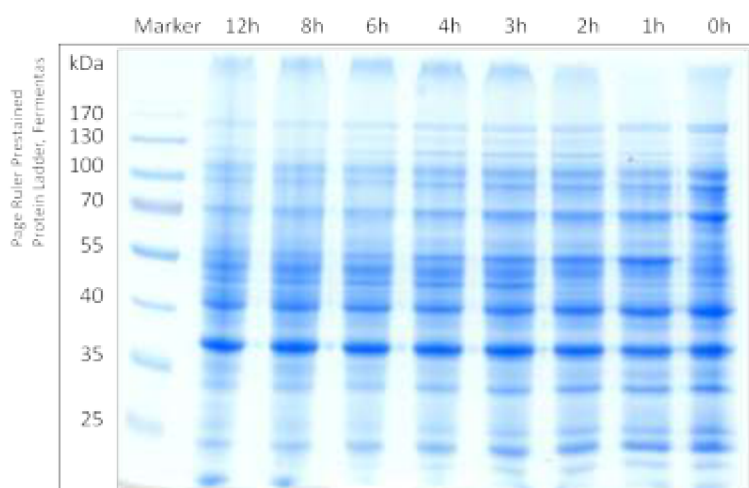


Abbildung 38: SDS-PAGE der Expressionskinetik für ConA-OspC in *E. coli* BL21 (DE3). Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific

Man erkannte eine schwache Induktionsbande ab 1 h nach IPTG-Zugabe. Aufgrund der Expressionskinetik wurde eine Expressionszeit von 1 h nach IPTG Gabe für weitere Expressionen ausgewählt. Da die induzierte Proteinbande bereits nach zwei Stunden wieder abgebaut zu werden schien, wurde eine Expressionszeit von 1 h veranschlagt. Das Protein ist für *E. coli* toxisch, da die Zellen kein gutes Wachstum aufwiesen und kurz nach Expressionsstart schon wieder stark abgebaut wurden.

Nach der Expression wurde das Fusionsprotein durch eine Inclusion body-Aufreinigung aus den *E. coli* Zellen gewonnen. In Abbildung 39 ist die SDS-PAGE des aufgereinigten

Fusionsproteins ConA-OspC zu sehen. Das Fusionsprotein hatte eine Größe von 56 kDa, wie vorausberechnet. Es setzte sich zusammen aus dem ConA Part mit 263 Aminosäuren, dem Linker mit 12 Aminosäuren und dem OspC Teil mit 220 Aminosäuren. Die Reinheit des Proteins lag bei ca. 85%.

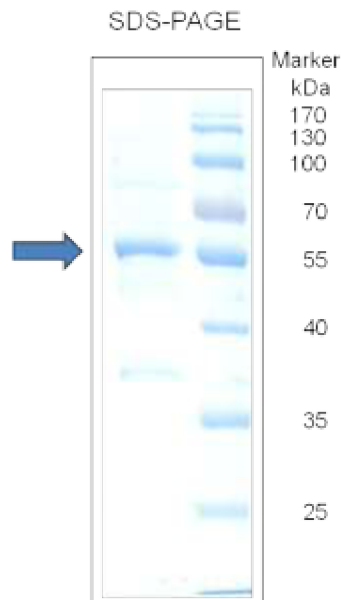


Abbildung 39: ConA-OspC Fusionsprotein nach Inclusion body Aufreinigung. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific

5.4.3 Assay Modell ConA-OspC

Dieses Fusionsprotein ermöglicht, durch seine beiden Komponenten, die Immobilisierung auf einer Zuckeroberfläche (Abbildung 40: Schritt 1 und 2), bei gleichzeitiger Bindung von anti-OspC-Antikörper aus einer Probenmatrix. Nach erfolgreicher Immobilisierung des Fusionsproteins kann das Serum appliziert werden (Schritt 3). Die gebildeten Antikörper gegen das *in vivo* Protein OspC, die von der infizierten Person gebildet werden, binden an die OspC-Domäne des Fusionsproteins auf der Oberfläche. Bei Verwendung einer markierungsfreien Detektionstechnologie wäre bereits in diesem Stadium des Assays eine Auswertung möglich. Für die Detektion in Polymersinterkörpern kann ein sekundärer gelabelter Antikörper dem Assay zugeführt werden (Schritt 4). Zudem ist durch die ConA-Domäne die Regeneration der Oberfläche durch Zugabe eines konkurrierenden Zuckers möglich z.B. α -D-Methylmannopyranose (Schritt 5).

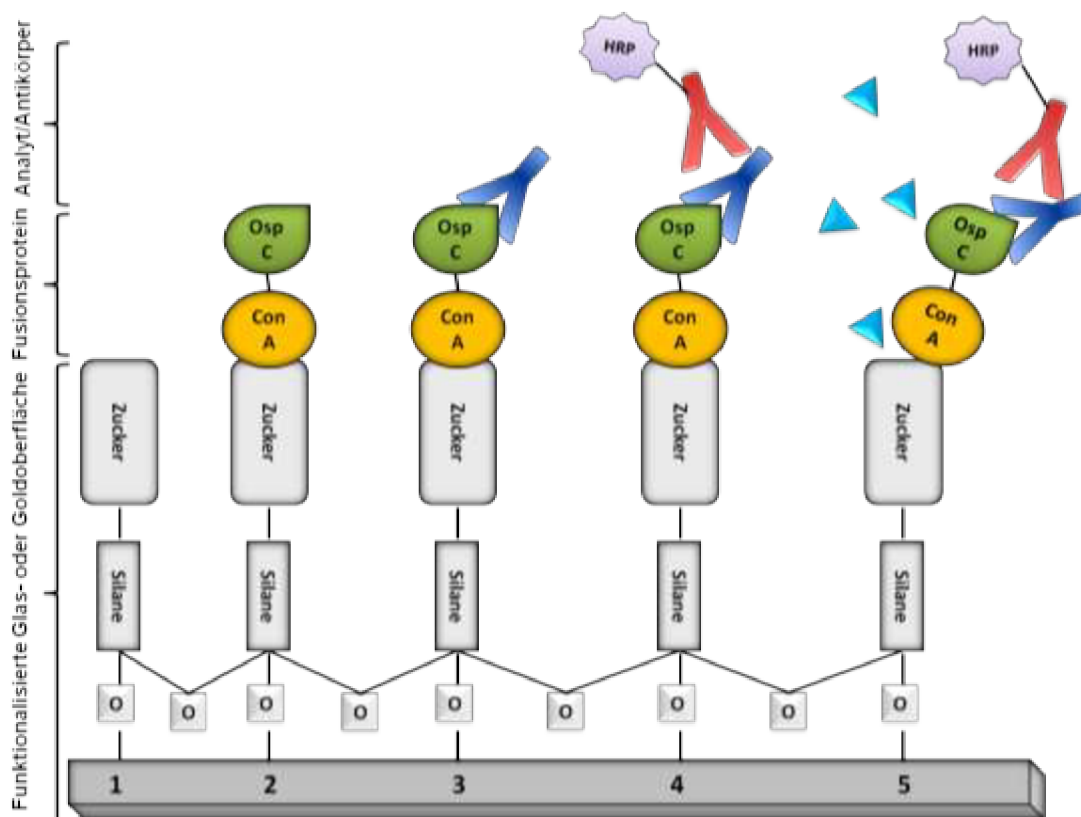


Abbildung 40: Konzept Assay ConA-OspC auf Zucker Oberfläche. 1: mit Zucker funktionalisierte Oberfläche, 2: Anbindung des Linkerproteins ConA-OspC, 3: Applikation des Testserums, 4: Detektion mittels markiertem sekundären Antikörper, 5: Mögliche Regeneration der Oberfläche mit α -D-Methylmannopyranose.

5.4.4 Oberflächen Plasmon Resonanz von ConA-OspC auf C-18 Oberfläche

Die Funktionalität des ConA-OspC Proteins wurde zuerst mittels SPR untersucht. Abbildung 41 zeigt das Sensorgramm einer SPR Messung. Es wurde eine C-18-funktionalisierte Goldoberfläche verwendet. Zu Beginn der Messung wurde das ConA-OspC Fusionsprotein mit einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ appliziert. Das Protein band auf der C-18-Oberfläche. Nach 850 sec. erfolgte ein Waschschrift mit PBS-Puffer um ungebundenes Protein zu entfernen. Nach Beendigung dieser Dissoziationsphase blieb ein resultierendes Signal von 110 Pixeln, was die Anbindung von ConA-OspC an die Oberfläche darstellte. Um ungebundene C-18-Ketten zu blockieren, wurde die BS appliziert. Die Blockierung mit der BS zeigte nach der Dissoziation nur einen geringen Anstieg im Signal, was auf eine gute Oberflächenbelegung mit Fusionsprotein schließen ließ. Im nächsten Schritt wurden zwei verschiedene anti-OspC negative Seren appliziert. Beide zeigten nach Dissoziation keine verbliebene Anbindung an die Oberfläche. Erst nach der

Applikation von einem positiven Serum (Vollbildserum Hd3) zeigte sich, nach der Dissoziationsphase, ein Anstieg von 25 Pixel. Dieser Anstieg repräsentierte die spezifische Anbindung der Antikörper im Serum an das Fusionsprotein auf der Oberfläche.

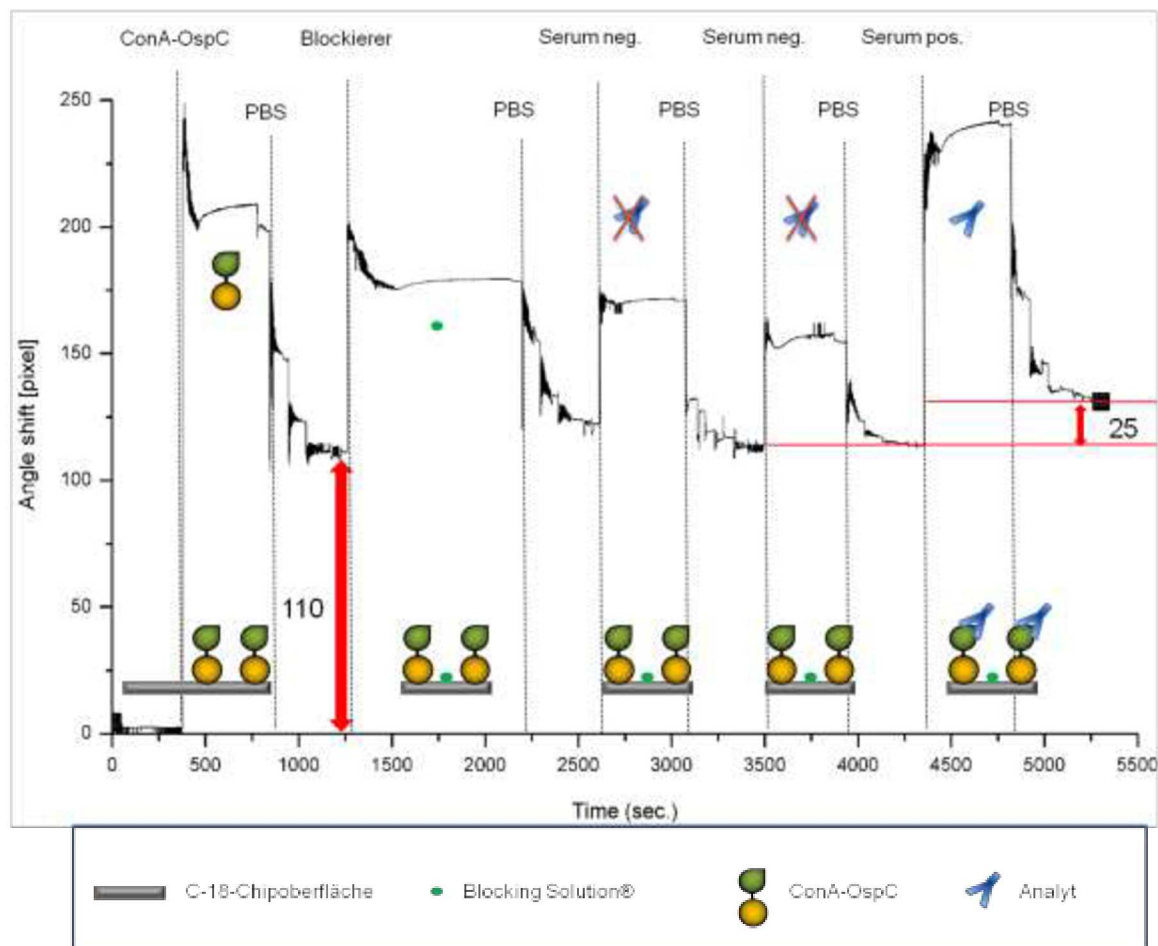


Abbildung 41: SPR-Sensorgramm von ConA-OspC auf einer C-18-funktionalisierten Goldoberfläche. Zuerst erfolgte die Anbindung von ConA-OspC auf die Oberfläche mit anschließender Blockierung mit BS. Danach erfolgte zweimal die Applikation eines anti-OspC negativen Serum mit anschließender Anbindung des Vollbildserums Hd3.

Die nachfolgende Tabelle gibt nochmal einen Überblick über die erhaltenen Messergebnisse.

Tabelle 31: Messdaten des SPR-Sensorgramms von ConA-OspC auf einer C-18-funktionalisierten Goldoberfläche

	ConA-OspC	Blockierung	Serum neg 1	Serum neg 2	Serum pos
Nettosignal [Pixel]	110	17	-17	0	25

5.4.5 Oberflächen Plasmon Resonanz von ConA-OspC auf Mannanoberfläche

In Abbildung 42 ist der Assay mit dem Fusionsprotein ConA-OspC auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche dargestellt. Es sind zwei voneinander unabhängige Versuche mit einem anti-OspC positiven (unten) und einem anti-OspC negativen Serum (oben) durchgeführt worden. Nach Aufnahme einer Basislinie wurde das Fusionsprotein ConA-OspC auf die Oberfläche appliziert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS-Puffer blieb in beiden Messungen ein vergleichbar hohes Signal von 135 und 124 Pixeln. Im nächsten Schritt wurde ein Blockierungsschritt mit der BS vorgenommen. Der Anstieg im Signal nach der Dissoziationsphase fiel nur sehr gering aus, was auf eine gute Oberflächenbelegung mit Fusionsproteinen schließen ließ. Im Anschluss an diese Dissoziationsphase wurde anti-OspC negatives Serum (oben) bzw. positives Serum (unten, Vollbildserum Hd3) appliziert. Im Fall des anti-OspC negativen Serums zeigte sich nach der Dissoziationsphase ein Restsignal von 3 Pixeln, beim anti-OspC positiven Serum zeigte sich hingegen ein signifikanter Signalanstieg von 30 Pixeln.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die erhaltenen Messergebnisse.

Tabelle 32: Messdaten der SPR-Sensorgramme von ConA-OspC auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche

	ConA-OspC	Blockierung	Serum pos/ Serum neg
Nettosignal [Pixel]	81	0	30
Nettosignal [Pixel] für Kontrollexperiment	75	0	3

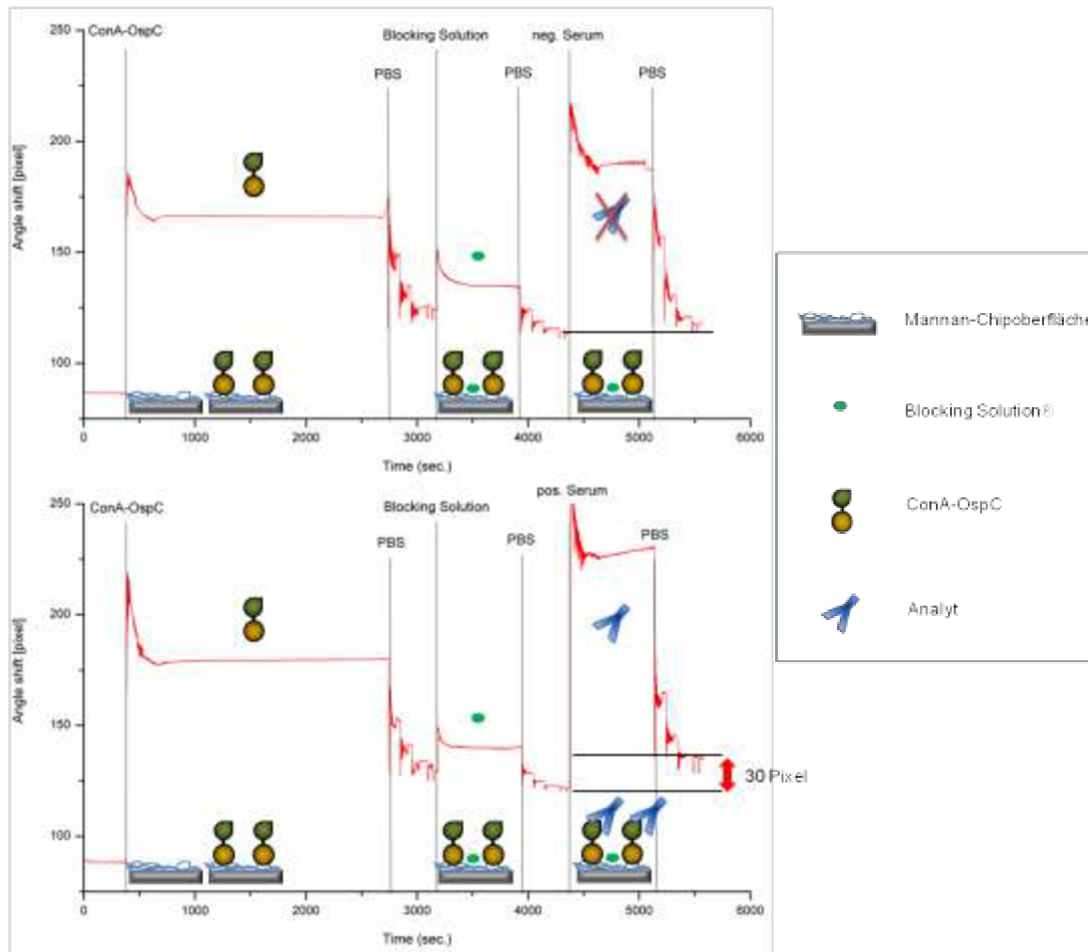


Abbildung 42: SPR-Sensorgramm von ConA-OspC auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche. Sensorgramm oben: Messung mit OspC negativem Serum; Sensorgramm unten: Messung mit OspC positivem Serum. Messablauf in beiden Fällen: Zuerst erfolgte die Anbindung des ConA-OspC auf die Mannanoberfläche mit anschließendem Blockierungsschritt mit BS. Im oberen Sensorgramm ist danach die Applikation des anti-OspC negativen Serums zu sehen, im unteren die Anbindung des anti-OspC positiven Serums.

5.4.6 Reflektometrische Interferenz Spektroskopie-Messungen auf Mannan-oberfläche

Weitere Untersuchungen wurden mit der RIfS durchgeführt. Die unten stehende Abbildung 43 zeigt zwei RIfS-Sensorgramme. Eine mit Mannan funktionalisierte Glasoberfläche wurde zuerst mit der BS behandelt, um Vakanzen der Oberfläche auszugleichen, und anschließend wurde das Fusionsprotein ConA-OspC injiziert. Nach einer kurzen Dissoziationsphase wurde anti-OspC-positives Serum Hd3 auf die Oberfläche appliziert. Das Sensorgramm zeigte nach abgeschlossener Dissoziationsphase

eine positive Anbindung von 185 IU.

Um zu ermitteln, ob diese Anbindung spezifisch war, wurde ein weiteres Experiment mit OspC-negativem Serum durchgeführt. Hierbei wurden alle Parameter, wie Inkubationszeit und Temperatur gleich gehalten, um die Ergebnisse untereinander vergleichen zu können. Zudem wurde der gleiche Chip verwendet, welcher nun in einem anderen Kanal gemessen wurde. Die mit Mannan funktionalisierte Glasoberfläche wurde zuerst mit der BS behandelt, um Vakanzen der Oberfläche auszugleichen und anschließend wurde das Fusionsprotein ConA-OspC injiziert. Nach abgeschlossener Dissoziationsphase wurde anti-OspC-negatives Serum SB1983 über die Oberfläche geleitet. Das Sensorgramm zeigte nach anschließender Dissoziationsphase keine Erhöhung des Signals.

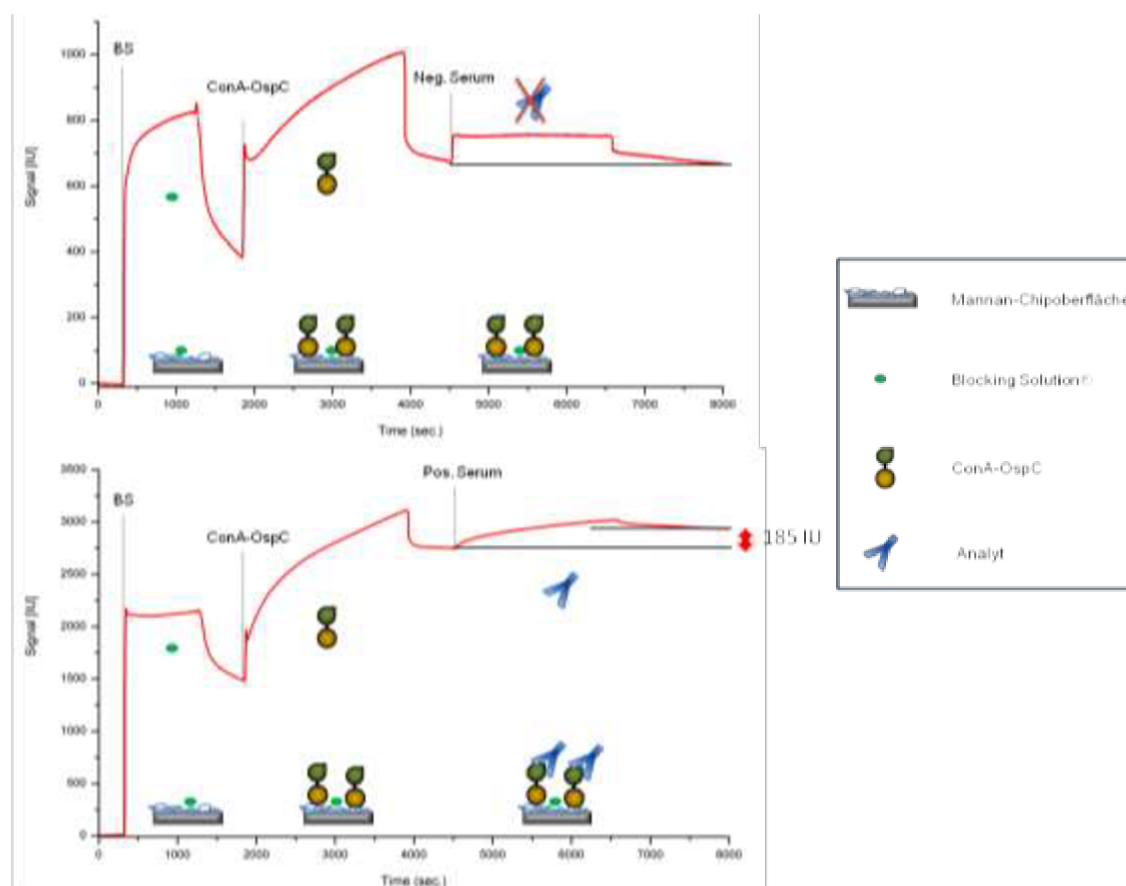


Abbildung 43: RfS-Sensorgramme ConA-OspC auf Mannanoberfläche; Oben: Blockierung der Oberfläche mit anschließender Applikation von ConA-OspC. Nach Anbindung des Fusionsproteins wurde anti-OspC Serum SB-1983 injiziert Unten: Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit anschließender Applikation von ConA-OspC. Nach Anbindung des Fusionsproteins wurde anti-OspC positives Vollbilderum Hd3 injiziert.

Wie in Abbildung 43 zu erkennen, zeigte das anti-OspC negative Serum SB-1983 nach der Dissoziationsphase keine Anbindung an das Fusionsprotein. Durch ein weiteres Kontrollexperiment sollte bewiesen werden, dass das OspC-positive Vollbildserum Hd3 ebenfalls keine unspezifische Anbindung an die blockierte Mannanoberfläche zeigt. Dieses Kontrollexperiment ist in Abbildung 44 zu sehen. Hierzu wurde die Mannanoberfläche zuerst blockiert und nach erfolgter Dissoziationsphase der BS wurde das OspC-positive Vollbildserum Hd3 appliziert. Nach abgeschlossener Dissoziationsphase zeigte sich keine Erhöhung des Signals. Im Gegenteil, das Signal zeigte eine eindeutige Drift nach unten. Somit war die in Abbildung 43 gezeigte Anbindung von ConA-OspC, an das positive Serum als spezifisch anzusehen und ein Nachweis war für eine ausreichende Funktion der OspC-Bindungsdomäne erbracht.

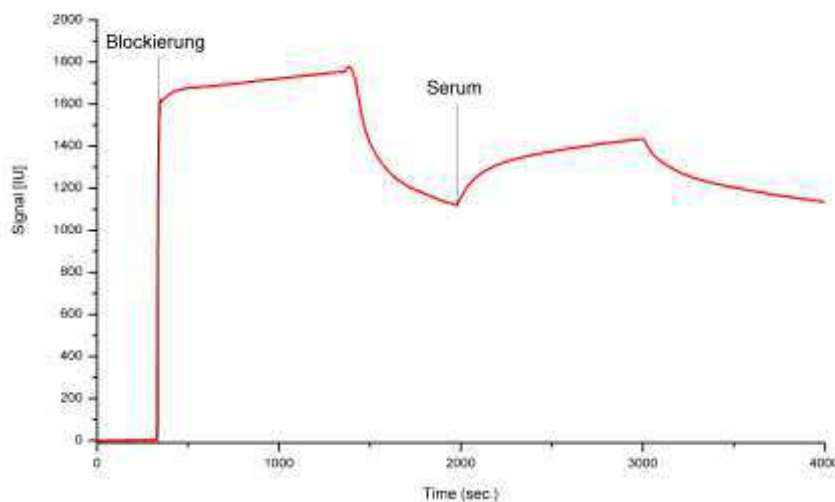


Abbildung 44:RIAS-Sensorgramm; Kontrollexperiment. Blockierung (unspezifische Bindungsstellen) der Mannanoberfläche mit anschließender Applikation des positiven Serums (Hd3).

5.5 Immunologische Detektion von Borreliose im Blutserum mittels ConA-C6

5.5.1 Klonierungsstrategie, Gensequenzen, Restriktionsanalysen ConA-C6

Das native VlsE Protein besteht aus zwei invariablen Sequenzen am Amino- und am Carboxyl-Ende. Diese beiden Sequenzen umschließen einen variablen Bereich, der aus mehreren Untereinheiten besteht (Liang et al. 2000). Die Sequenz des IR6 hat sich bei der Antikörperantwort als sehr effektiv herausgestellt. Eine ausführliche Erläuterung zu die-

sem Thema ist in der Einleitung in Kapitel 1.3.1.1.2 zu finden. Für die Erstellung des Fusionsproteins wurde die Gensequenz des C6 Epitops aus *Borrelia garinii* Klon P7-1 verwendet. Das C6 Epitop stellte sich in diesem Fall, als das am konserviertesten unter den Bakterienstämmen heraus. Zur Verbindung der beiden Proteindomänen wurde auch hier der flexible GS-Linker verwendet, wie bereits in Kapitel 5.4.1 erwähnt.

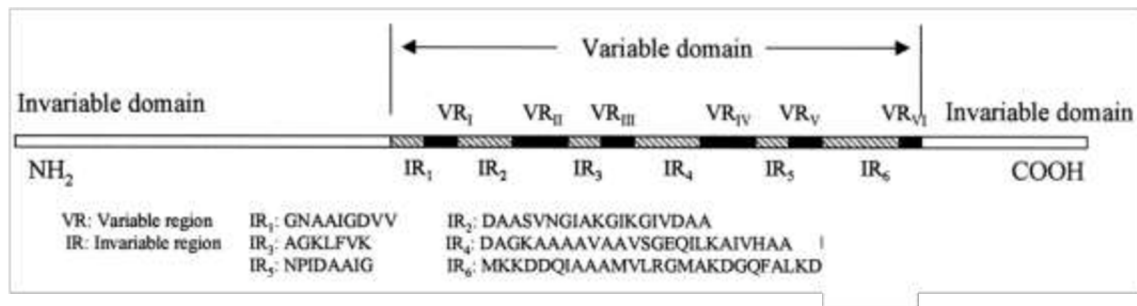
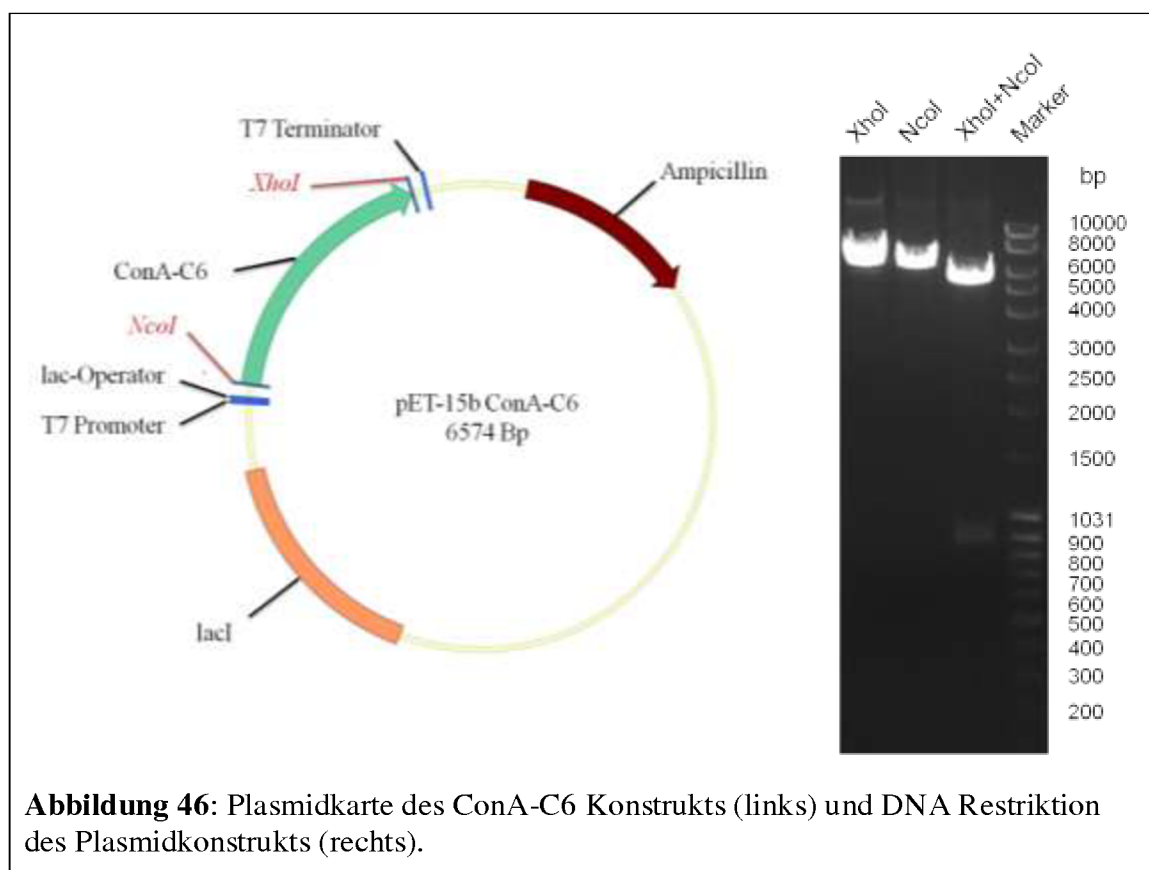


Abbildung 45: Strukturkarte des VlsE Proteins nach Liang et al., 2000

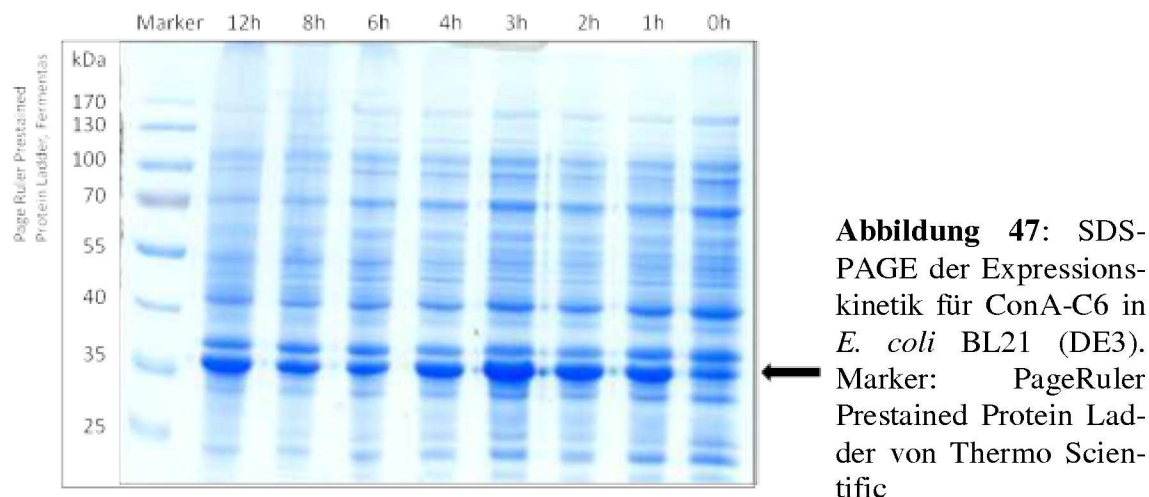
Das C6 Epitop wurde C-terminal an die cDNA-Sequenz des pre-pro-ConA, mittels einer kurzen Linkersequenz kloniert. Als Expressionsvektor diente der pET-15b Vektor. Auf ein Aufreinigungs-Tag wurde verzichtet, da sich das Protein aufgrund der ConA-Domäne während der Expression in Inclusion bodies abscheiden würde. Um die Rückfaltung des Proteins so gering wie möglich negativ zu beeinflussen, wurden nur die wichtigsten Komponenten im Genkonstrukt berücksichtigt. Zur Proteinexpression wurde der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) verwendet.

Abbildung 46 zeigt die Plasmidkarte des ConA-C6-Konstruktes. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die Restriktionsanalyse zu sehen. Das Gesamtkonstrukt hatte eine Größe von 6574 Basenpaaren. Nach der Restriktion mit den Enzymen *Xho*I und *Nco*I, die ebenfalls zur Klonierung verwendet wurden, zeigte sich ein Vektorfragment mit der Größe von 5666 Basenpaaren und ein Insertfragment mit 908 Basenpaaren.

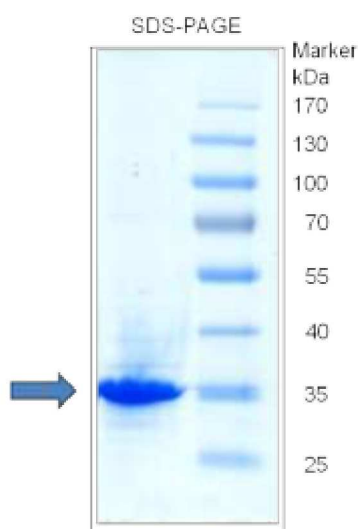


5.5.2 Expressionskinetik und Proteinaufreinigung von ConA-C6

Ein ausgewählter positiver Klon wurde zur Transformation in *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Es wurde eine Expressionskinetik über 12 h durchgeführt, um den richtigen Zeitpunkt für die Zellernte zu ermitteln. Die Zellen wurden in flüssigem LB Medium auf eine optische Dichte von 0,8 angezogen und mit IPTG wurde die Proteinexpression induziert. Im Folgenden wurde anfangs jede Stunde eine Probe entnommen und mit fortschreitender Zeit alle 2 bis 4 Stunden. Die Proben wurden aufgearbeitet und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 47).



Die Expressionskinetik ließ bereits vor Induktion mit IPTG eine Basalexpression erkennen. Aufgrund der Stärke der Expression wurde eine Expressionszeit von 3-4 h nach IPTG-Zugabe für die weiteren Arbeiten ausgewählt. Nach Ernte und Inclusion body-Aufreinigung wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Das Fusionsprotein zeigte, wie erwartet, ein Molekulargewicht von 35 kDa (Abb. 48). Es setzte sich zusammen aus dem ConA-Part mit 263 AS, dem Linker mit 15 AS und dem C6 Epitop mit 25 AS. Die Reinheit der Proteinaufreinigung lag bei ca. 95%.



5.5.3 Assay Modell ConA-C6

Durch die Fusion der beiden Domänen ConA und C6 kann auch dieses Fusionsprotein auf einer mit Zucker funktionalisierten Oberfläche immobilisiert werden (Abbildung 49: Schritt 1 und 2). Durch die gerichtete Immobilisierung auf der Zuckeroberfläche wird die C6 Domäne im Idealfall nach oben ausgerichtet, um im Anschluss (Schritt 3) die Antikörper gegen VlsE, die sich im Serum befinden, zu binden. Bei Gebrauch einer markierungsfreien Technologie ist auch hier wieder bereits in diesem Stadium eine Auswertung möglich. In Polymersinterkörpern muss ein gelabelter, sekundärer Antikörper hinzugefügt werden, um eine Detektion zu ermöglichen. Auch hier bietet die ConA-Domäne im Anschluss wieder die Möglichkeit zur Regeneration der Zuckeroberfläche, durch die Zugabe eines Puffers mit einem konkurrierenden Zucker (Schritt 5).

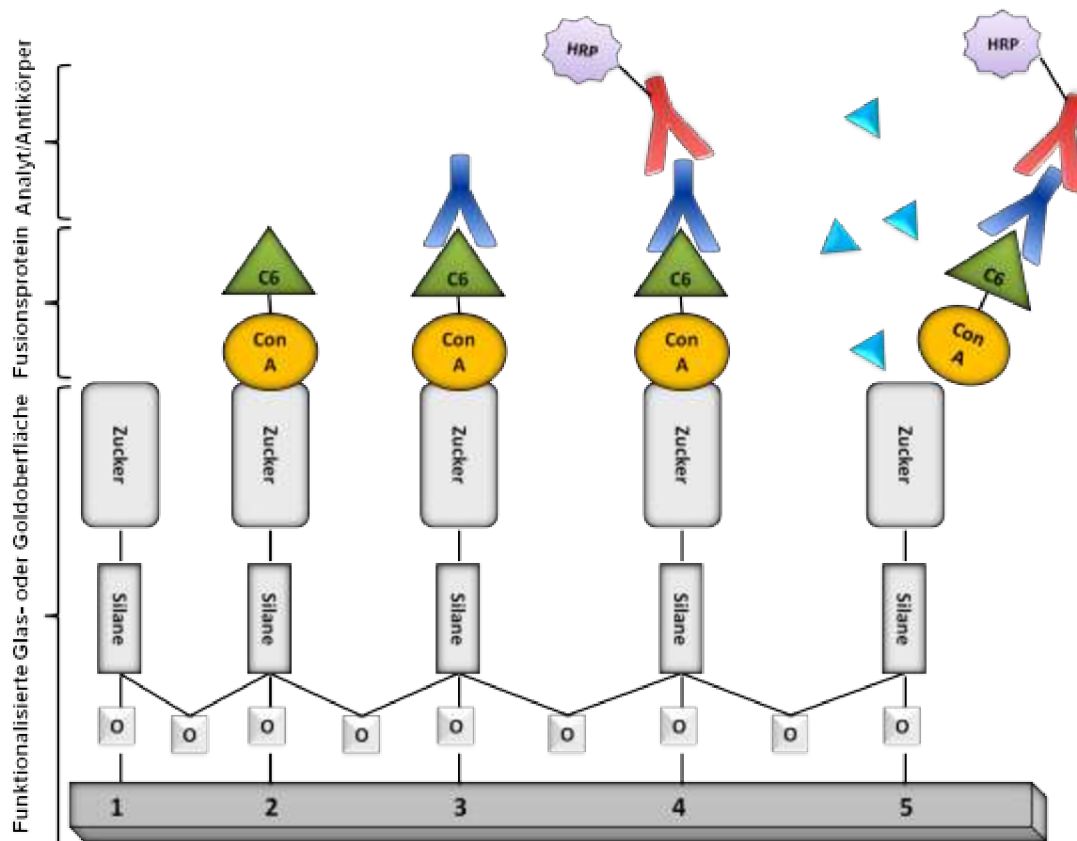


Abbildung 49: Konzept Assay ConA-C6- auf Zucker Oberfläche 1: mit Zucker funktionalisierte Oberfläche, 2: Anbindung des Linkerproteins ConA-OspC, 3: Applikation des Testserums, 4: Detektion mittels markiertem sekundären Antikörper, 5: Mögliche Regeneration der Oberfläche mit α -D-Methylmannopyranose

5.5.4 Oberflächen Plasmon Resonanz von ConA-C6 auf C-18 Oberfläche

Die Funktionalität des Fusionsproteins ConA-C6 wurde zuerst durch SPR Messungen untersucht. In Abbildung 50 sind zwei voneinander unabhängige Versuche zu sehen, welche mit einem positiven (oben) und einem negativen Serum (unten) durchgeführt worden sind. Für beide Messungen wurde eine C-18-funktionalisierte Goldoberfläche verwendet. Nach Aufnahme einer Basislinie wurde das Fusionsprotein ConA-C6 auf die Oberfläche appliziert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS-Puffer blieb in beiden Messungen ein vergleichbar hohes Signal von 147 und 138 Pixeln. Im nächsten Schritt wurde ein Blockierungsschritt vorgenommen, mit der Injektion von der BS. Der Anstieg im Signal nach der Dissoziationsphase fiel nur sehr gering aus, was auf eine gute Oberflächenbelegung mit dem Fusionsprotein schließen ließ. Im Anschluss wurde das anti-VlsE positive bzw. negative Serum auf die Oberfläche appliziert. Im Fall des anti-VlsE positiven Serums zeigte sich nach der Dissoziation eine positive Anbindung von 45 Pixeln. Das anti-VlsE negative Serum hingegen zeigte keinerlei Anbindung an das Fusionsprotein auf der Oberfläche.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die erhaltenen Messergebnisse.

Tabelle 33: Messdaten der SPR-Sensorgramme von ConA-C6 auf einer C-18-funktionalisierten Goldoberfläche

	ConA-C6	Blockierung	Serum pos/ Serum neg
Nettosignal [Pixel]	147	17	45
Nettosignal [Pixel] für Kontrollexperiment	138	20	0

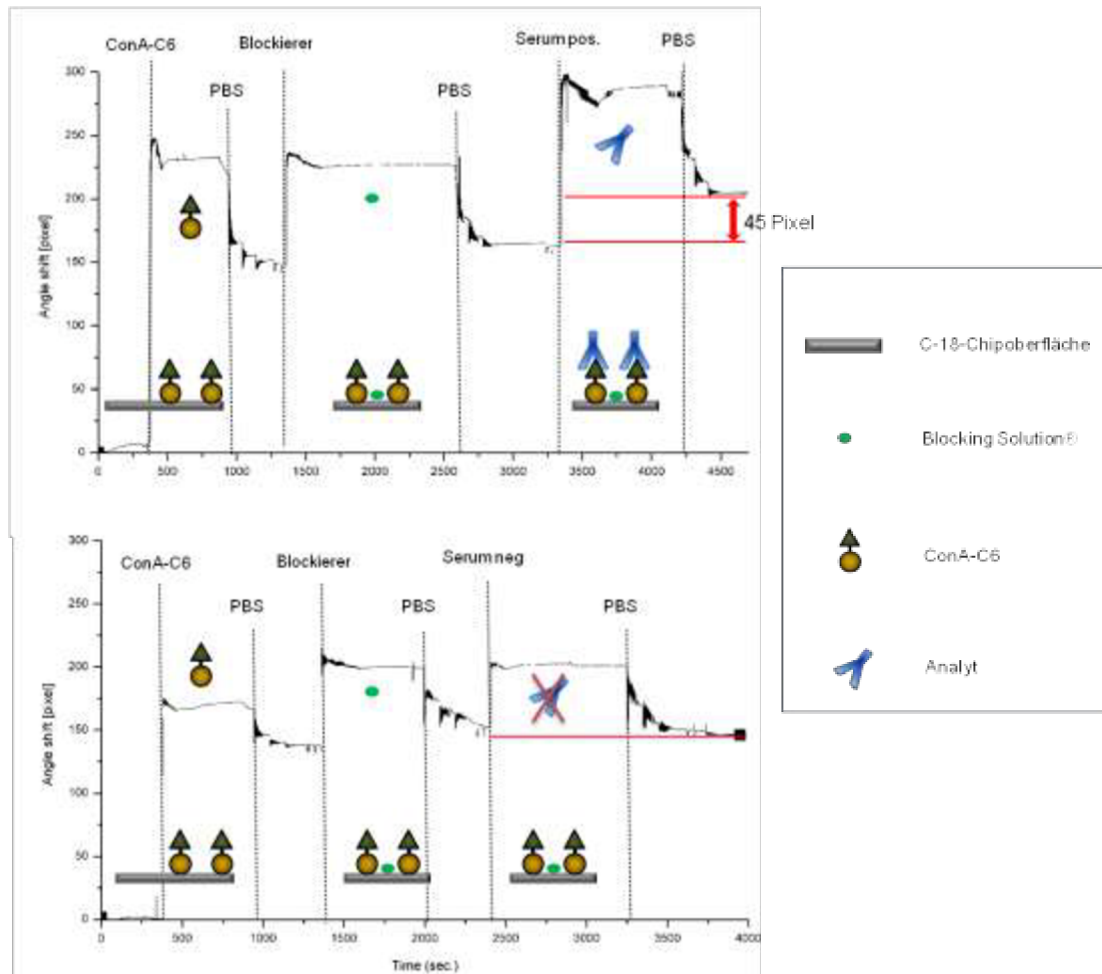


Abbildung 50: SPR-Sensorgramm von ConA-C6 auf einer C-18-funktionalisierten Goldoberfläche. Sensorgramm oben: Messung mit VLsE positivem Serum; Sensorgramm unten: Messung mit VLsE negativem Serum. Messablauf in beiden Sensorgrammen: Anbindung des ConA-C6 auf die C-18 Oberfläche mit anschließender Blockierung mit BS. Daraufhin erfolgte im oberen Sensorgramm die Applikation des anti-VlsE positiven Vollbildserums Hd3, im Fall des unteren Sensorgramms die Applikation des anti-VlsE negativen Serums SB-1983.

5.5.5 Oberflächen Plasmon Resonanz von ConA-C6 auf Mannanoberfläche

Die folgende Abbildung zeigt den Testassay von ConA-C6 auf einer Mannanoberfläche mit Realproben. Diese Messung wurde mittels Oberflächen Plasmon Resonanz durchgeführt. Es sind zwei voneinander unabhängige Versuche, mit einem anti-VlsE positiven (oben) und einem anti-VlsE negativen Serum (unten), durchgeführt worden. Nach Aufnahme einer Basislinie wurde das Fusionsprotein ConA-C6 auf die Oberfläche appliziert und anschließend mit BS behandelt. Nach einer Dissoziationsphase wurden die Seren zugegeben. Nach Applikation des positiven Vollbildserums Hd3 zeigte sich eine spezifische

Anbindung von 149 Pixeln. Im Fall des Kontrollversuchs mit negativem Serum SB-1983 zeigte sich keine Anbindung.

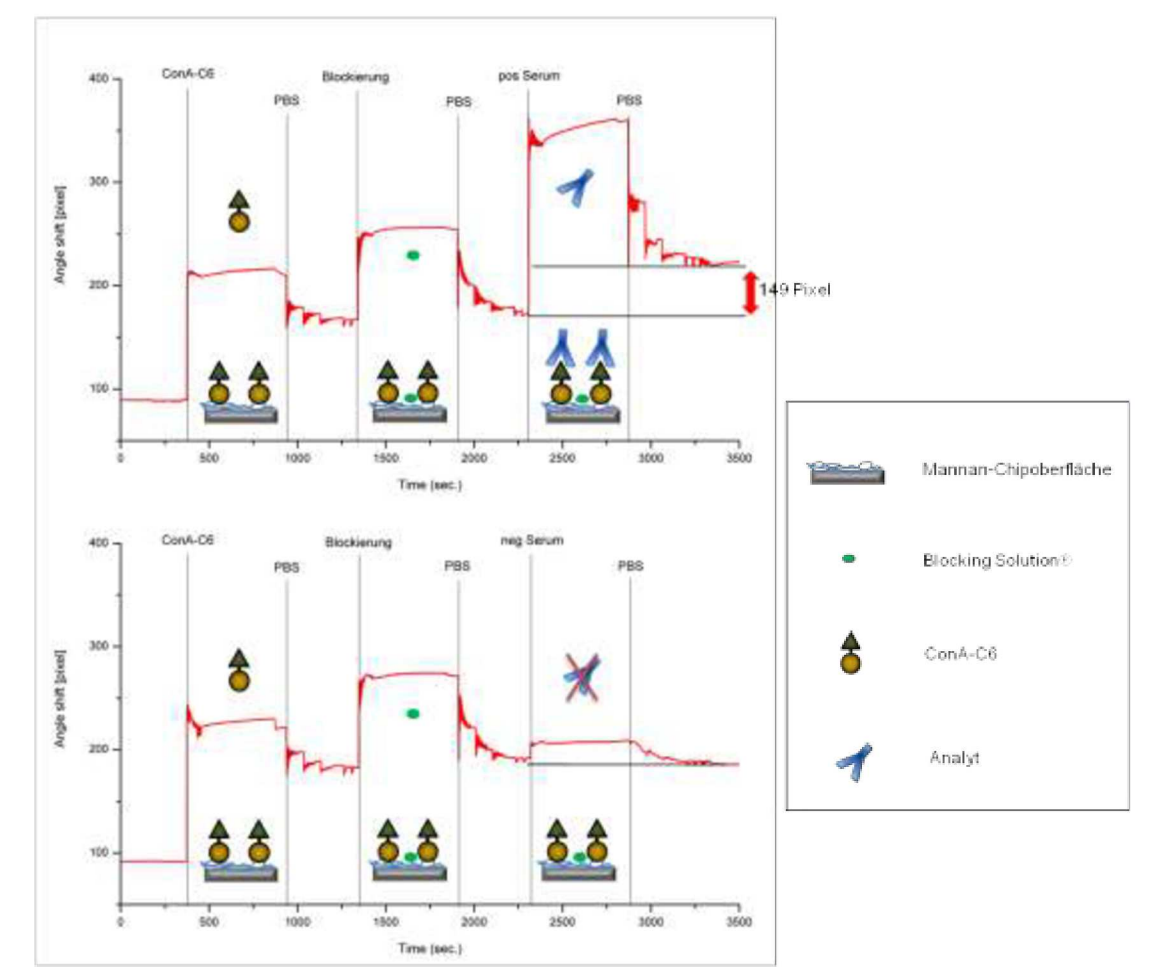


Abbildung 51: SPR-Sensorgramm von ConA-C6 auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche. Sensorgramm oben: Messung mit VlsE positivem Vollbildserums Hd3; Sensorgramm unten: Messung mit VlsE negativem Serum SB-1983

Die nachfolgende Tabelle zeigt die erhaltenen Messergebnisse.

Tabelle 34: Messdaten der SPR-Sensorgramme von ConA-C6 auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche

	ConA-C6	Blockierung	Serum pos/ Serum neg
Nettosignal [IU]	77	6	149
Nettosignal [IU] für Kontrollexperiment	91	7	0

5.5.6 RIfS Messungen auf Mannanoberfläche

Um die Funktionalität auf einer anderen Messplattform zu bestätigen, wurden die Anbindungen der Seren an das Fusionsprotein C6-ConA mittels Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie (RIfS) gemessen.

Die folgende Abbildung 52 zeigt eine Messung auf einer Mannanoberfläche. Nach der Behandlung mit BS wurde das Fusionsprotein ConA-C6 injiziert und darauf folgend das anti-VlsE positive Vollbildserum Hd3. Es zeigte sich eine spezifische Anbindung des Serums von 90 IU, die durch nachfolgende Kontrollexperimente bestätigt wurde.

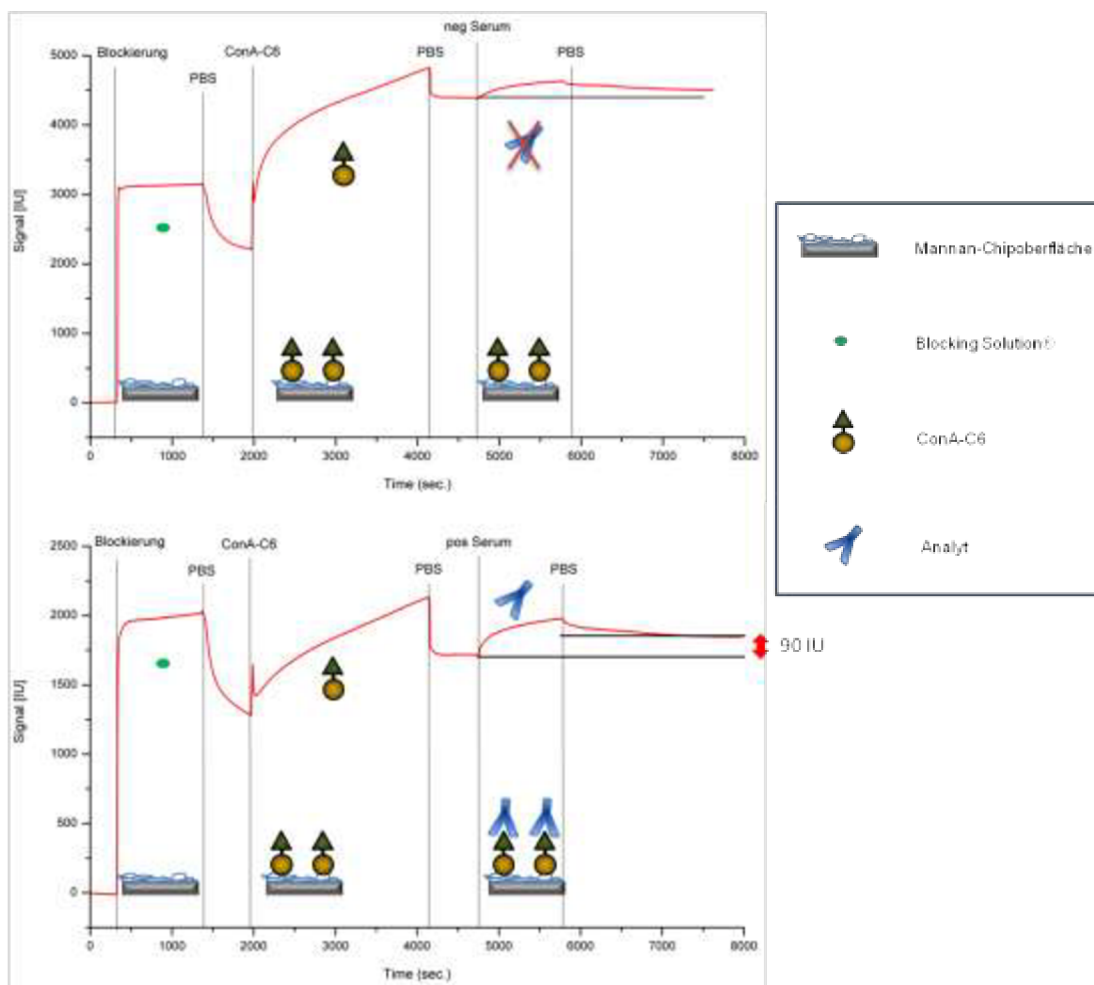


Abbildung 52: RIfS-Sensorgramm von ConA-C6 auf Mannanoberfläche. Oben: Blockierung von Vakanzen der Mannanoberfläche mit anschließender Applikation von ConA-C6. Darauf folgende Injektion von anti-VlsE negativem Serum (SB-1983; Kontrollversuch). Unten: Blockierung der Mannanoberfläche mit anschließender Applikation von ConA-C6. Das anti-VlsE positive Serum Hd3 zeigt eine Anbindung von 90 IU nach Dissoziation am Ende der Messung.

Als erstes Kontrollexperiment wurde ein anti-VlsE negatives Serum gemessen (Abb.52). Die Mannanoberfläche wurde mit BS behandelt und anschließend wurde das ConA-C6 auf der Oberfläche gebunden. Danach wurde ein anti-VlsE negatives Serum (SB-1983) über die Oberfläche geleitet. Dieses Serum zeigte eine leicht unspezifische Anbindung, wobei hier die Verlaufsform des Signals rückgängig war. Der Wert von ca. 10 IU fiel auch deutlich geringer aus, als bei der Messung mit VlsE-positivem Serum von 90 IU. Das zusätzliche Kontrollexperiment aus Abbildung 44 hatte auch hier seine Gültigkeit.

5.6 ELISA Messungen mit ConA-OspC und ConA-C6 in direktem Vergleich zur Ermittlung der Signifikanz

Wie im Methodenteil unter Kapitel 4.4.2.1 beschrieben, wurden mit den beiden Fusionsproteinen ConA-C6 und ConA-OspC ELISA-Messungen durchgeführt (Abb. 53). Die Fusionsproteine wurden mit drei verschiedenen positiven Seren getestet. Zum einen wurde für beide Fusionsproteine das Vollbildserum Hd3 angewendet sowie spezifische Seren. Für ConA-OspC wurde das spezifische Serum CL-140 und für ConA-C6 das Serum CL-141 verwendet. CL-140 wies nur Antikörper gegen OspC auf und CL-141 nur Antikörper gegen VlsE auf. Als Kontrollen wurden 4 negative Seren getestet, die keinerlei Antikörper gegen Borrelien aufwiesen sowie Versuche, in denen kein Serum appliziert wurde oder kein Fusionsprotein. Die hellgrauen Balken repräsentieren die Messungen mit dem Fusionsprotein ConA-C6, die dunkelgrauen Balken ConA-OspC. Wie in der Abbildung 55 zu erkennen ist, zeigten beide Fusionsproteine im ELISA ein hohes Signal für die positiven Seren, für die negativen Seren nur sehr schwache Signale. Es fiel auf, dass die Signale des Fusionsproteins ConA-OspC allgemein schwächer ausfielen, als die des Fusionsproteins ConA-C6. Dies könnte an der schlechteren Stabilität des Proteins liegen.

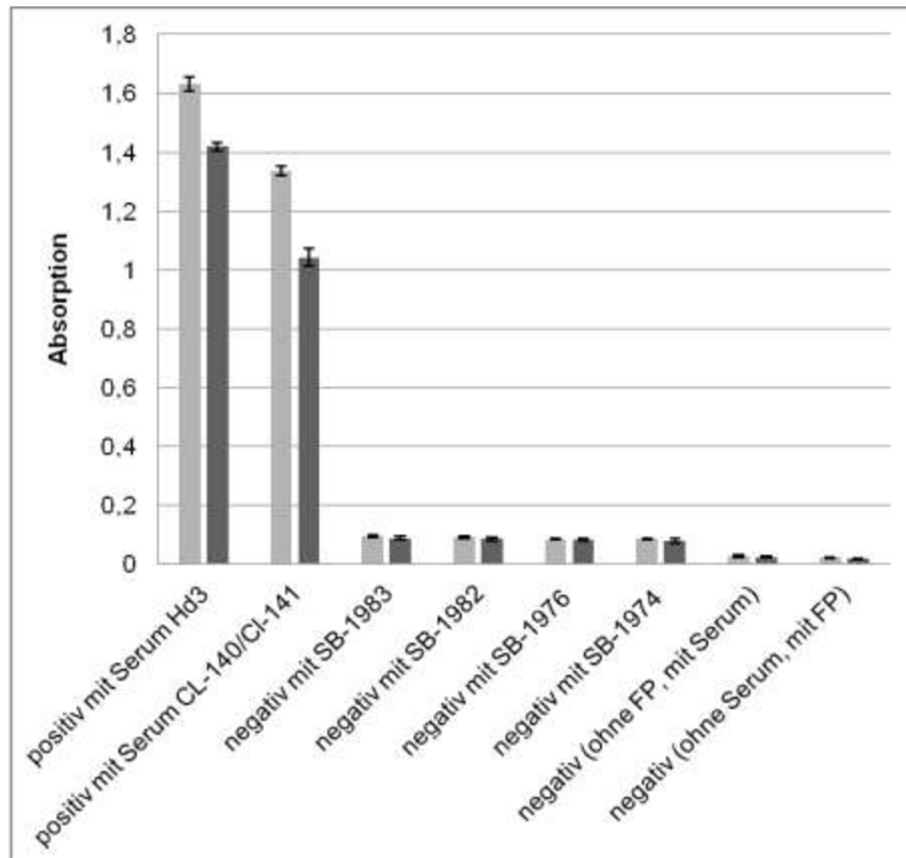


Abbildung 53: ELISA Messung von ConA-C6 und ConA-OspC auf Mannanoberfläche. Auf der y-Achse ist die Absorption bei 450nm aufgetragen, wobei der Hintergrund bei 620 nm schon subtrahiert wurde. Jeweils n=6

Abbildung 53 zeigt die graphische Auswertung der ELISA-Tests. Man erkennt in den Kontrollexperimenten ein Grundrauschen bis zu einer Absorption von ca. 0,1. Die Messungen, in denen kein Linkerprotein, bzw. kein Serum im Test verwendet wurden, fielen sogar noch viel geringer aus. Es zeigte sich also eine leichte unspezifische Anbindung von negativem Serum, innerhalb des Assays, die allerdings vernachlässigbar erscheint. Die positiven Messwerte von ConA-C6 lagen bei einer Absorption von 1,62, in Fall des Vollbildserums Hd3 und von 1,35 bei Verwendung des Serums CL-141. Das Fusionsprotein ConA-OspC zeigte bei Messung mit Vollbildserum Hd3 eine Absorption von 1,41 und bei Serum CL-140 einen Messwert von ca. 1,5. Die Messwerte der positiven Proben lagen somit sogar mehr als 10 fach höher zum Hintergrundrauschen, welches durch die Messung der negativen Seren ermittelt wurde.

Die erste allgemeine Anforderung bei einer Signalauswertung bestimmt, dass ein positives Signal mindestens 2,5 fach höher sein muss, als das Grundrauschen. Diese Anforderung

rung wurde erfüllt und es kann ein Test auf Signifikanz der Messwerte erfolgen. Hierzu wurde zuerst die Hypothese 0 postuliert, dass alle Messwerte, die sich aus den Kontroll-experimenten bei Verwendung der negativen Seren ergaben, keine Signale darstellten sondern ein Grundrauschen waren und wurden somit als Nullwert definiert. Zudem wurde als zweite Hypothese definiert, dass die Signale, die bei Messung der anti-OspC und anti-VlsE positiven Seren erhoben wurden, als signifikant positiv gelten sollten. Hierzu musste als Bedingung die Differenz zwischen den negativen und positiven Signalen höher ausfallen, als der Wert des Grundrauschens selbst. Dies ist ebenfalls gegeben. Nun konnte der p-Wert errechnet werden.

Formel zur Errechnung des p-Wertes:

$$P(Y \geq y|H_0) = \sum_{j=0}^6 \binom{n}{j} \left(\frac{1}{2}\right)^j \left(1 - \frac{1}{2}\right)^{n-j} + \sum_{j=k}^n \binom{n}{j} \left(\frac{1}{2}\right)^j \left(1 - \frac{1}{2}\right)^{n-j}$$

wobei $Y=|K-50\%$ der durchgeführten Versuche (Anzahl der Versuche, die den zu erwartenden Wert als Ergebnis haben), n =Anzahl der durchgeführten Versuche und k = die Anzahl der Versuche, die den im Hypothese 0 eingeschlossenen Ergebnis erbracht haben.

Der p-Wert kann Aufschluss über das Signifikanzniveau geben. Im Fall dieser Messung lag der p-Wert bei 0,9999. Die genauen Messdaten mit denen die Rechnung durchgeführt wurde sind im Anhang Kapitel 8.5 einzusehen. Bei einer Umrechnung in Prozent ergibt sich ein Signifikanzniveau von 99,99%. Erst ab einem Signifikanzniveau von unter 5% wäre die Hypothese 0 und demzufolge auch die Hypothese 1 abzulehnen. Dies war nicht der Fall. Daher ließ sich schlussfolgern, dass die Messwerte mit den Seren Hd3 und CL-140/141 signifikant positiv ausfallen, in Bezug auf die durchgeführten Kontrollexperimente.

5.7 Langzeitstudien zur Haltbarkeit der Fusionsproteine ConA-OspC und ConA-C6

Da sich eine Lagerung der Proteine in Flüssigkeit bei -20°C über längere Zeit als unbrauchbar herausgestellt hat, wurde eine Lyophilisierung in Betracht gezogen. Um die

besten Bedingungen für die Lyophilisierung und anschließende Lagerung herauszufinden, wurden verschiedene Ansätze in 96Well Platten durchgeführt. Es wurden Experimente auf hydrophober Oberfläche sowie auf mit Mannan funktionalisierter Polystyrenoberfläche durchgeführt. Zur Erstellung der Langzeitstudien wurden die Fusionsproteine jeweils in den 96 Well Platten inkubiert und nach einem Blockierungsschritt mit der BS lyophilisiert. Die Lyophilisierung erfolgte unter verschiedenen Bedingungen. Zum einen in PBS-Puffer, ohne stabilisierende Reagenzien als Vergleichswert, mit der Zugabe von 10% Saccharose und mit einem kommerziellen Produkt, dem *Liquid Plate Sealer*[®] (LPS), von Candor Bioscience. Die Platten wurden anschließend bei 4°C, -20°C und -80°C gelagert. Nun wurden direkt nach der Lyophilisierung und in den Wochen danach regelmäßig bis zu 180 Tage Platten der Chargen entnommen und getestet. Die Testung erfolgte immer nach dem gleichen Protokoll, wie es im Methodenteil Kapitel 4.4.2 beschrieben ist. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Diagrammen dargestellt.

In der folgenden Abbildung dieses Kapitels sind Balkendiagramme zu sehen, in denen die gemessenen Absorptionen gegen die Zeit aufgetragen sind. Diese sind jeweils für die drei Lagerungsbedingungen gruppiert. Innerhalb jedes Diagramms ist eine rote Linie zu sehen, die das Grundrauschen der Messmethode darstellt. Sie liegt bei ca. 0,1. Wie im vorherigen Kapitel schon beschrieben, ist die erste allgemeine Anforderung bei einer Signalauswertung, dass ein positives Signal mindestens 2,5 fach höher sein muss, als das Grundrauschen. Aus diesem Grund ist zusätzlich in jedem Diagramm eine grüne Linie eingezeichnet, um diesen Schwellenwert darzustellen.

5.7.1 Langzeitstudie für ConA-OspC

5.7.1.1 Hydrophobe Immobilisierung

Die unten stehende Abbildung 54 zeigt den Verlauf der ELISA Messungen von ConA-OspC unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, bei vorheriger hydrophober Immobilisierung des Fusionsproteins ohne stabilisierende Zusätze. Zu Beginn der Studie lagen die Signale aller Lagerungsbedingungen bei einem Wert von ca. 1,25. Bis zu einer Woche fiel dieser Wert nur geringfügig auf einen Level von ca. 1,18.

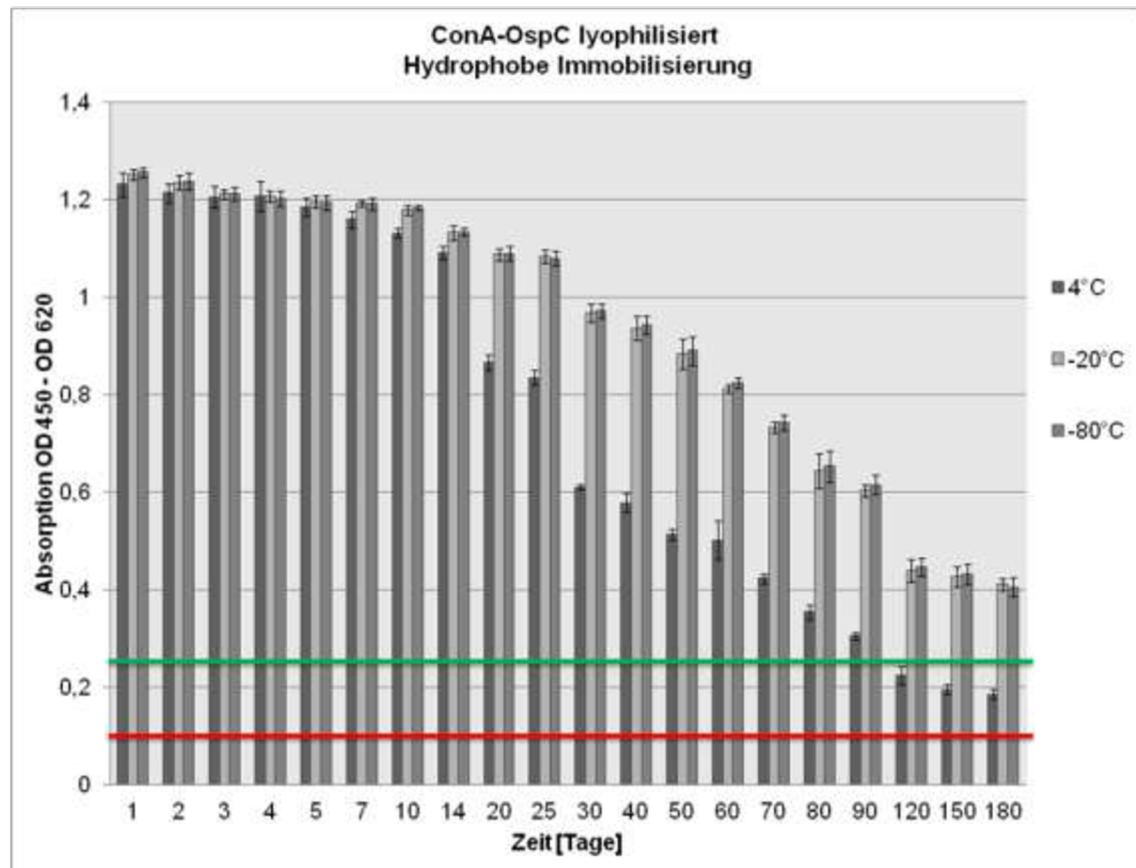


Abbildung 54: ELISA Messung von ConA-OspC mittels hydrophober Immobilisierung ohne Zusätze bei Lyophilisierung. Dargestellt sind die Messergebnisse der verschiedenen Lagerungsbedingungen nach den jeweiligen Tagen. n=6

Nach einer Woche erkannte man die ersten Unterschiede unter den jeweiligen Lagerungsbedingungen. Bei Lagerung im Kühlraum bei 4°C nahm die Signalstärke ab diesem Zeitpunkt stärker ab, als bei den anderen Lagerbedingungen. Bei -20°C und -80°C war ebenfalls eine stetige Abnahme des Signals zu beobachten, jedoch nicht so rapide wie bei 4°C. Nach 180 Tagen lag die Signalthöhe bei Lagerung in -20°C und -80°C bei einem Wert von ca. 0,4, bei Lagerung in 4°C hingegen nur noch 0,18. Dieses Signal konnte nicht mehr von dem Hintergrundrauschen unterschieden werden.

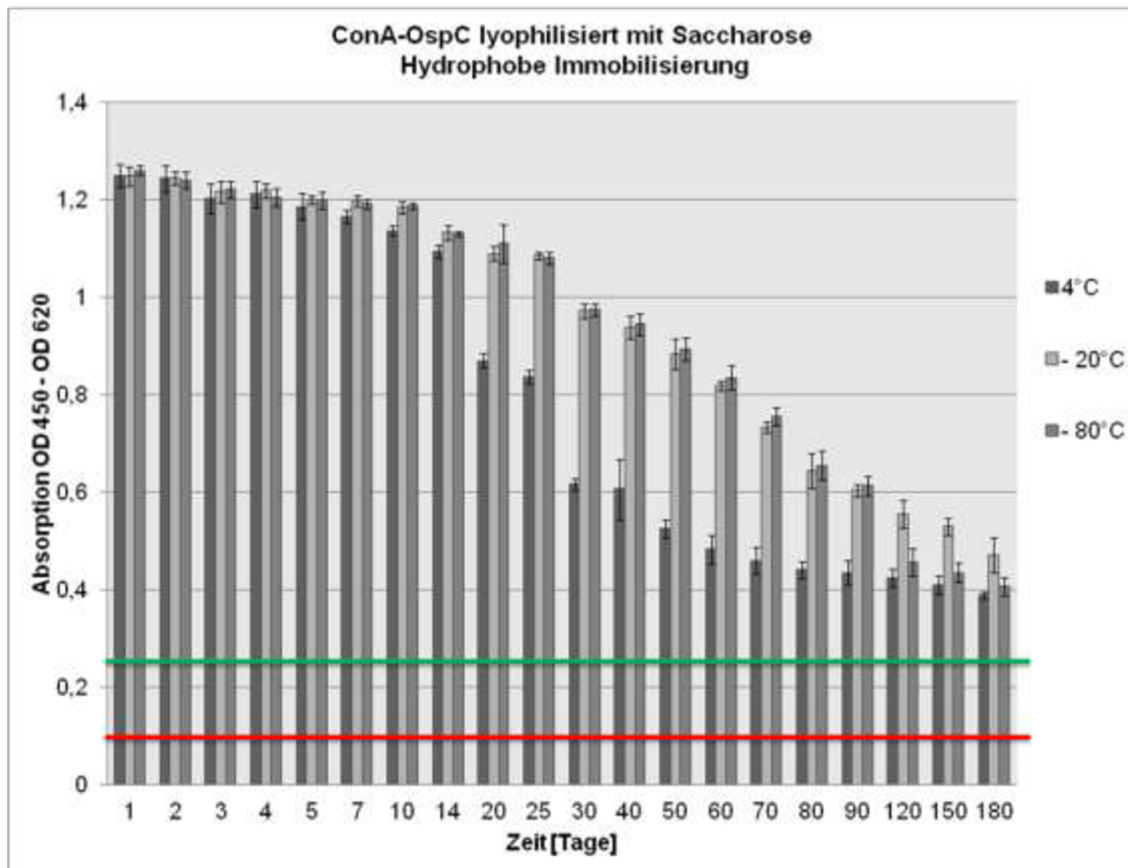


Abbildung 55: ELISA Messung von ConA-OspC mittels hydrophober Immobilisierung mit Zusatz von 10% Saccharose bei Lyophilisierung. Dargestellt sind die Messergebnisse der verschiedenen Lagerungsbedingungen nach den jeweiligen Tagen. n=6

Abbildung 55 zeigt den zeitlichen Verlauf der ELISA Experimente mit ConA-OspC bei hydrophober Immobilisierung. Hier wurde bei der Lyophilisierung als Zusatz 10% Saccharose addiert, um das Protein während dessen zu stabilisieren. Dies sollte sich auch in den anschließenden ELISA Messungen bemerkbar machen, da durch die Stabilisierung des Proteins während der Lyophilisierung eine größere Menge funktionales Protein für die ELISA Messung zur Verfügung stehen sollte. Wie zu bemerken ist, begannen die erhaltenen Signalstärken im gleichen Absorptionsbereich wie im Experiment zuvor und zeigten auch einen ähnlichen Verlauf, während der fortschreitenden Zeit. Der Unterschied machte sich jedoch in der ersten bis zweiten Woche der Lagerung bemerkbar. Auch hier fiel die Signalstärke der Proben bei Lagerung in 4°C schneller ab, als bei -20°C und -80°C. Allerdings fiel auf, dass durch den Zusatz von Saccharose dieser Signalabstieg später eintrat als bei Lyophilisierung ohne stabilisierende Zusätze. Nach 180 Tagen lag die

Signalhöhe bei Lagerung in -20°C bei einem Wert von ca. 0,48, bei Lagerung in 4°C und -80°C hingegen nur noch bei ca. 0,4.

Die unten stehende Abbildung 56 zeigt den Verlauf der ELISA Messungen von ConA-OspC unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, bei vorheriger hydrophober Immobilisierung des Fusionsproteins mit Stabilisierung durch den LPS. Zu Beginn der Studie lagen die Signale aller Lagerungsbedingungen bei einem Wert von ca. 1,28. Bis zu einer Woche Lagerungszeit zeigten sich, neben einer leichten Signalreduktion auf ca. 1,18, kaum Unterschiede im Signal, unter den verschiedenen Bedingungen. Hier fiel nach einer Woche das Signal bei 4°C Lagerungstemperatur rapide ab, stabilisierte sich aber bei einem Wert von ca. 0,56 und behielt diesen auch bis zum Ende der 180 Tage stabil bei. Die Signale der Temperaturen -20°C und -80°C nahmen über die Zeit der 180 Tage konstant ab und fielen ebenfalls auf das Niveau von 0,56.

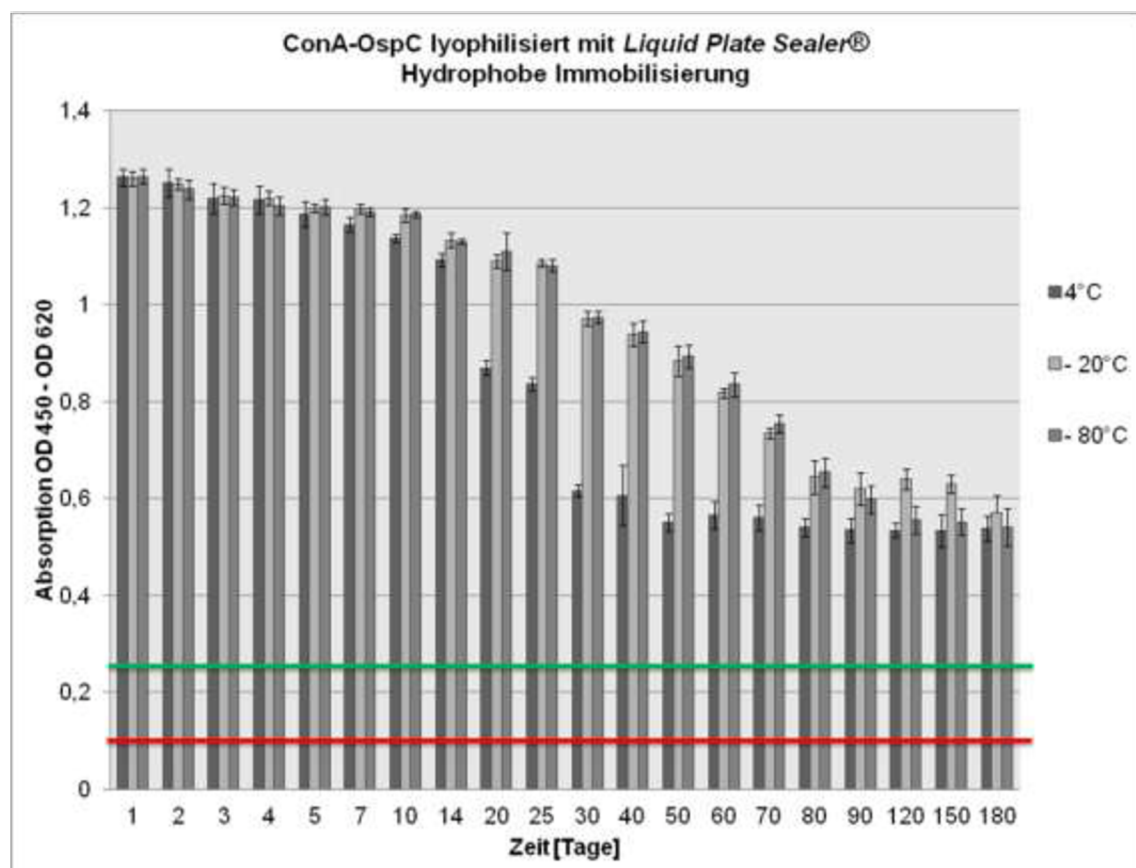


Abbildung 56: ELISA Messung von ConA-OspC mittels hydrophober Immobilisierung mit Zusatz von LPS bei Lyophilisierung. Dargestellt sind die Messergebnisse der verschiedenen Lagerungsbedingungen nach den jeweiligen Tagen. n=6

5.7.1.2 Mannanoberfläche

Die gleichen drei Messreihen, wie oben beschrieben, wurden ebenfalls auf mit Mannan funktionalisierten 96 Well Platten durchgeführt. Abbildung 57 zeigt den Messreihenverlauf von ConA-OspC, ohne Zusätze bei der Lyophilisierung. Die Messungen starteten bei einer Absorption von 0,86 und sanken innerhalb der ersten 7 Tage unter einen Wert von 0,7. Zu diesem Zeitpunkt machte sich auch der Unterschied in den Lagerungsbedingungen bemerkbar. Nach Ablauf der ersten Woche sank die Signalstärke bei 4°C Lagerungsbedingung viel schneller, als bei -20°C und -80°C. Nach 50 Tagen war das Signal bei 4°C nicht mehr vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden. Bei -20°C und -80°C trat dies nach Ablauf von 70 Tagen ein. Im Anschluss blieb das Signal bis Ablauf der 180 Tage stabil, war aber nicht mehr als eindeutiges Signal zu interpretieren.

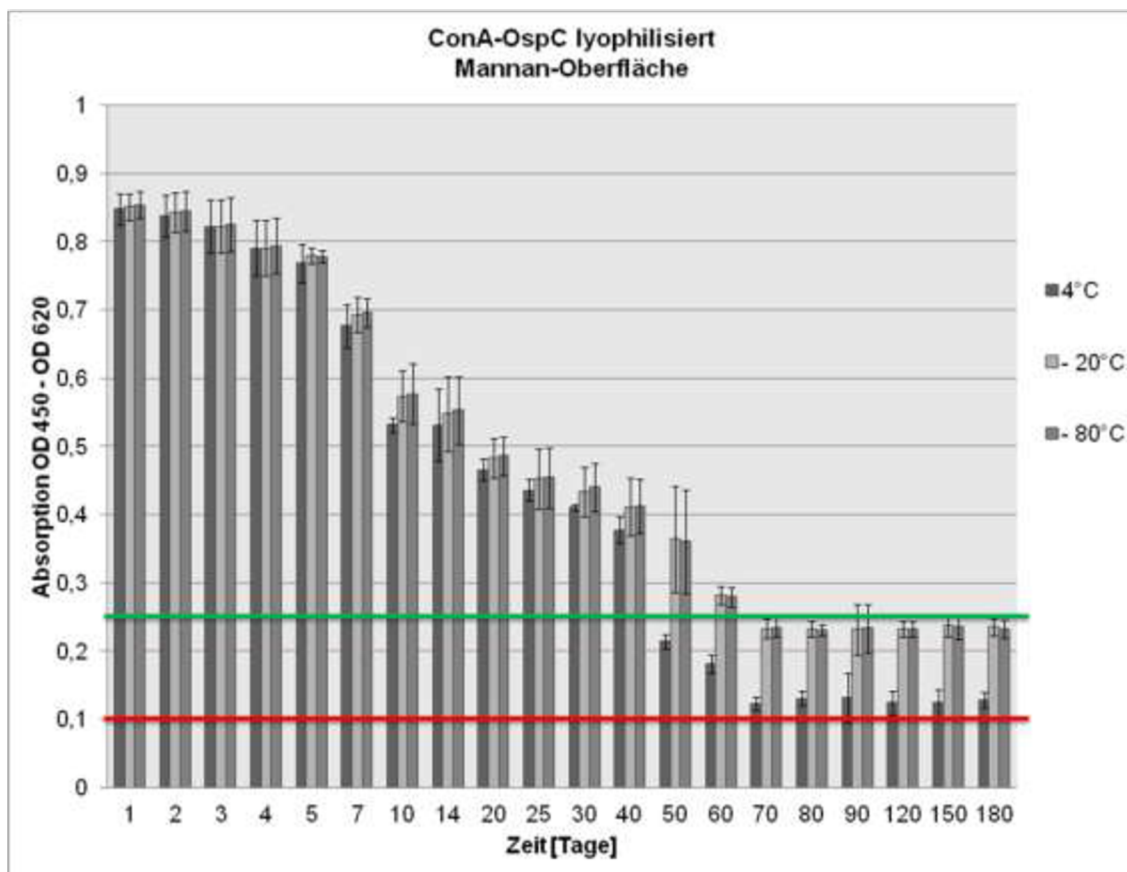


Abbildung 57: ELISA Messung von ConA-OspC auf Mannanoberfläche ohne Zusätze bei Lyophilisierung. Dargestellt sind die Messergebnisse der verschiedenen Lagerungsbedingungen nach den jeweiligen Tagen. n=6

Die unten stehende Abbildung 58 zeigt im Vergleich zur vorherigen Messreihe die Ergebnisse von ConA-OspC bei Zugabe von 10% Saccharose, bei Lyophilisierung auf

Mannanoberfläche. Der Verlauf der Messreihe ist vergleichbar zur vorherigen, nur zeigte sich hier bei Zugabe von Saccharose eine verbesserte Lagerungsstabilität in 4°C. Das Anfangssignal betrug auch hier wieder ca. 0,86 und sank im Verlauf der ersten Woche auf unter 0,7. Bis zum Ablauf von 40 Tagen sanken die Signalstärken aller Lagerungsbedingungen gleichmäßig, auf ähnlicher Signalthöhe, bis auf einen Wert um die 0,4. Erst nach 50 Tagen zeigte die Signalstärke bei 4°C einen stärkeren Rückgang und sank schlussendlich nach Ablauf der 180 Tage in das Hintergrundrauschen bei einem Wert um die 0,15. Bei den Lagerungstemperaturen -20°C und -80°C wurde die Unterschreitung der Signalstärke erst nach Ablauf der 70 Tage erreicht und stagnierte danach bei einem Wert um die 0,23.

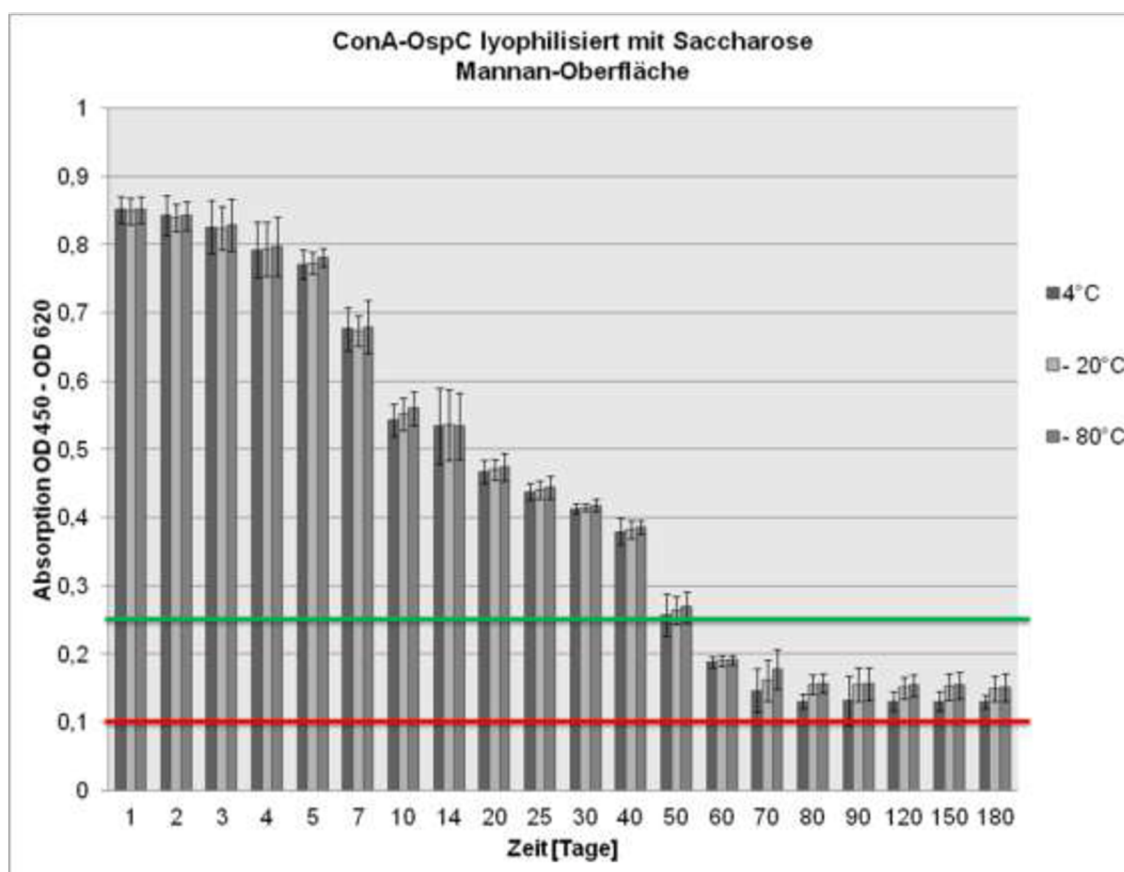


Abbildung 58: ELISA Messung von ConA-OspC auf Mannanoberfläche mit Zusatz von 10% Saccharose bei Lyophilisierung. Dargestellt sind die Messergebnisse der verschiedenen Lagerungsbedingungen nach den jeweiligen Tagen. n=6

Abbildung 59 zeigt die Ergebnisse die, mit dem LPS bei Lyophilisierung des ConA-OspC auf Mannanoberfläche, erzielt wurden. In dieser Messreihe war nur ein leichter Rückgang des Signals über die Zeit zu verzeichnen. Alle drei Lagerungsbedingungen starteten bei

einer Signalstärke um die 0,86 und fielen damit in ihrer Signalthöhe fast gleich aus. Der Verlauf aller drei Lagerungsbedingungen ähnelte sich, selbst nach Ablauf der ersten 30 Tage. In dieser Zeit sank das Signal in allen Proben auf einen Wert um die 0,65. Das Signal behielt danach aber eine relativ konstante Höhe, selbst nach 180 Tagen Lagerung. Es pendelte sich bei allen Messreihen auf einen Wert um die 0,63 ein.

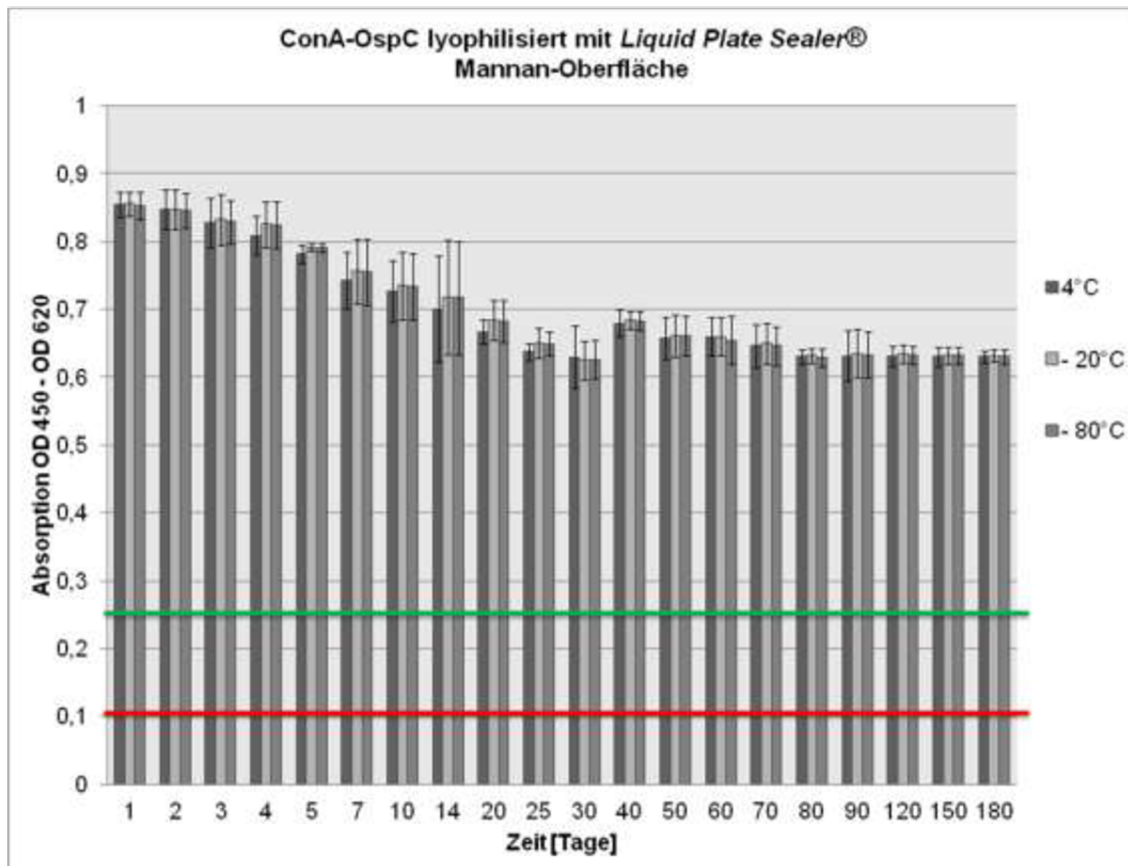


Abbildung 59: ELISA Messung von ConA-OspC auf Mannanoberfläche mit Zusatz von LPS bei Lyophilisierung. Dargestellt sind die Messergebnisse der verschiedenen Lagerungsbedingungen nach den jeweiligen Tagen. n=6

5.7.2 Langzeitstudie für ConA-C6

5.7.2.1 Hydrophobe Immobilisierung

Abbildung 60 zeigt den Verlauf der ELISA Messungen von ConA-C6 unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, bei vorheriger hydrophober Immobilisierung des Fusionsproteins ohne stabilisierende Zusätze. Zu Beginn der Studie lagen die Signale aller Lagerungsbedingungen bei einem Wert von ca. 1,45. Innerhalb der ersten zwei Wochen fiel dieser Wert nur geringfügig auf einen Level von ca. 1,32. Nach zwei Wochen erkannte

man die ersten Unterschiede unter den jeweiligen Lagerungsbedingungen. Bei Lagerung im Kühlraum bei 4°C nahm die Signalstärke ab diesem Zeitpunkt stärker ab, als bei den anderen Lagerbedingungen. Bei -20°C und -80°C war ebenfalls eine stetige Abnahme des Signals zu beobachten, jedoch nicht so rapide wie bei 4°C. Nach 180 Tagen lag die Signalthöhe bei Lagerung in -20°C und -80°C bei einem Wert von ca. 0,65, bei Lagerung in 4°C hingegen nur noch 0,5. Dieses Signal war geringer als bei den anderen Lagerungsbedingungen, jedoch verblieb es über dem Niveau des Hintergrundrauschens.

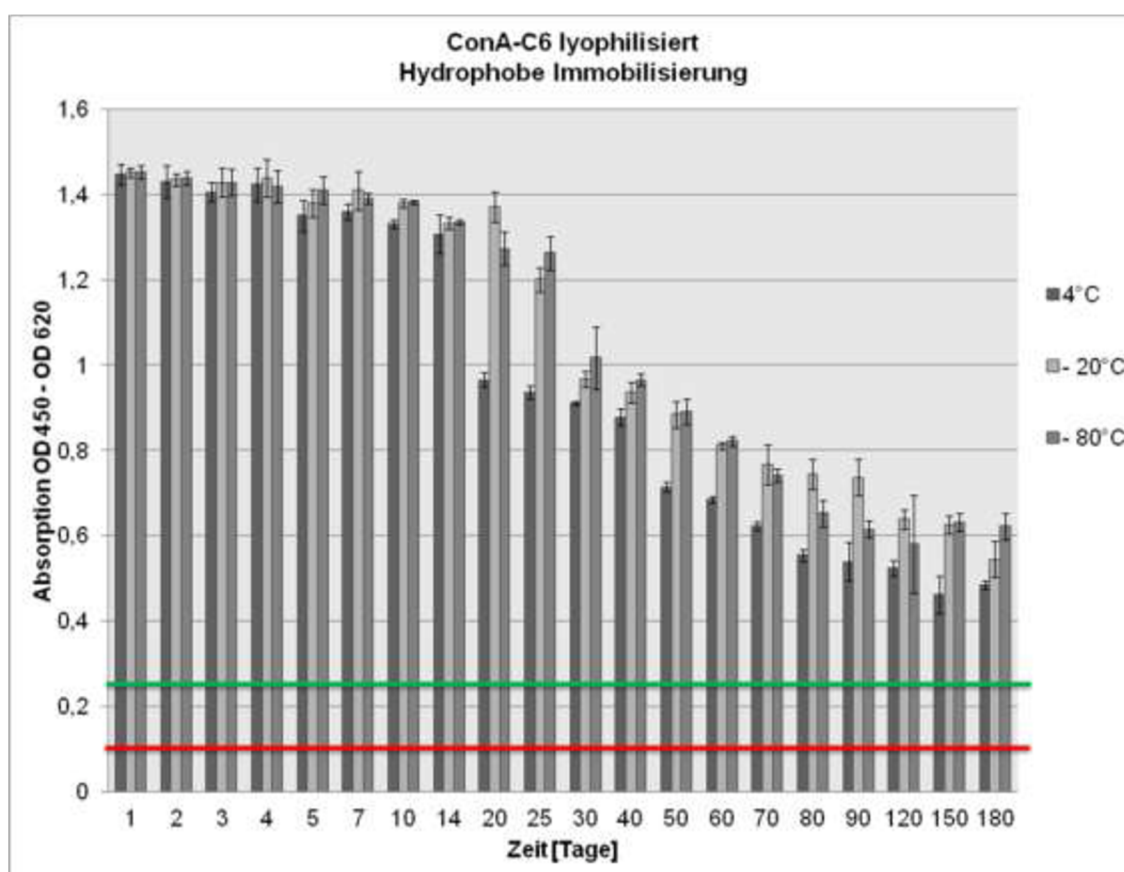


Abbildung 60: ELISA Messung von ConA-C6 mittels hydrophober Immobilisierung ohne Zusätze bei Lyophilisierung. Dargestellt sind die Messergebnisse der verschiedenen Lagerungsbedingungen nach den jeweiligen Tagen. n=6

Abbildung 61 zeigt den zeitlichen Verlauf der ELISA Experimente mit ConA-C6 bei hydrophober Immobilisierung unter verschiedenen Lagerungsbedingungen. Hier wurde bei der Lyophilisierung als Zusatz 10% Saccharose addiert um das Protein während der Lyophilisierung zu stabilisieren. Wie zu bemerken ist, begannen die Ergebnisse nicht im gleichen Absorptionsbereich wie im Experiment ohne Zusätze zuvor, sondern um ca. 0,2 höher, zeigten aber einen ähnlichen Verlauf während der fortschreitenden Zeit. Allerdings

machte sich der Unterschied im Verlauf bei Lagerung in 4°C bemerkbar. Hier fiel das Signal nicht nach 2 Wochen ab, sondern blieb bis zum Ende der 180 Tage gleichauf mit den anderen Lagerungsbedingungen. Zum Abschluss der Lagerungszeit wiesen sogar alle durchgeführten Messungen eine vergleichbare Höhe im Signal auf, mit nur leichter Tendenz nach unten bei 4°C.

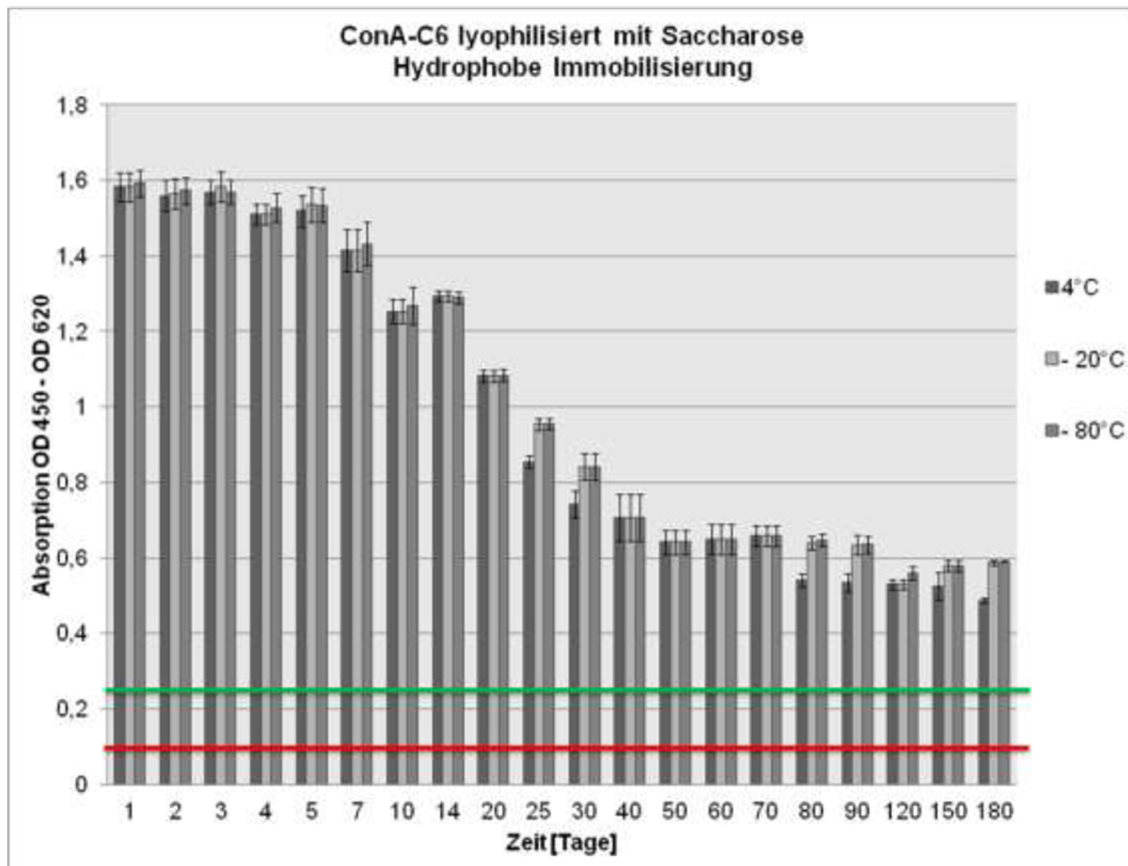


Abbildung 61: ELISA Messung von ConA-C6 mittels hydrophober Immobilisierung mit Zusatz von 10% Saccharose bei Lyophilisierung. Dargestellt sind die Messergebnisse der verschiedenen Lagerungsbedingungen nach den jeweiligen Tagen. n=6

Die unten stehende Abbildung 62 stellt den zeitlichen Verlauf der ELISA Messungen von ConA-C6 bei hydrophober Immobilisierung dar. Zur Lyophilisierung wurde der LPS genutzt. Auch hier wurden die Proben bei 4°C, -20°C und -80°C gelagert. Der Start sowie der Verlauf der Messreihen sahen ähnlich zum vorherigen Experiment aus, in welchem Saccharose als Stabilisator bei der Lyophilisierung verwendet wurde; allerdings zeigte sich hier auch noch ein positiver Unterschied. Die Signalhöhe der ELISA Messungen aus allen drei Lagerungsbedingungen fielen nach Ablauf von 180 Tagen auf eine gleiche Signalhöhe ab, wie in der vorherigen Messung, aber die Signalhöhe war nun wesentlich hö-

her als im vorher gezeigten Experiment. Anstatt auf 0,5-0,6 zu fallen, blieb das Signal bei allen drei Lagerungsbedingungen um die 0,6 bis 0,7. Es zeigte sich auch keine weitere Tendenz nach unten, was eine noch längere Lagerungszeit begünstigen würde.

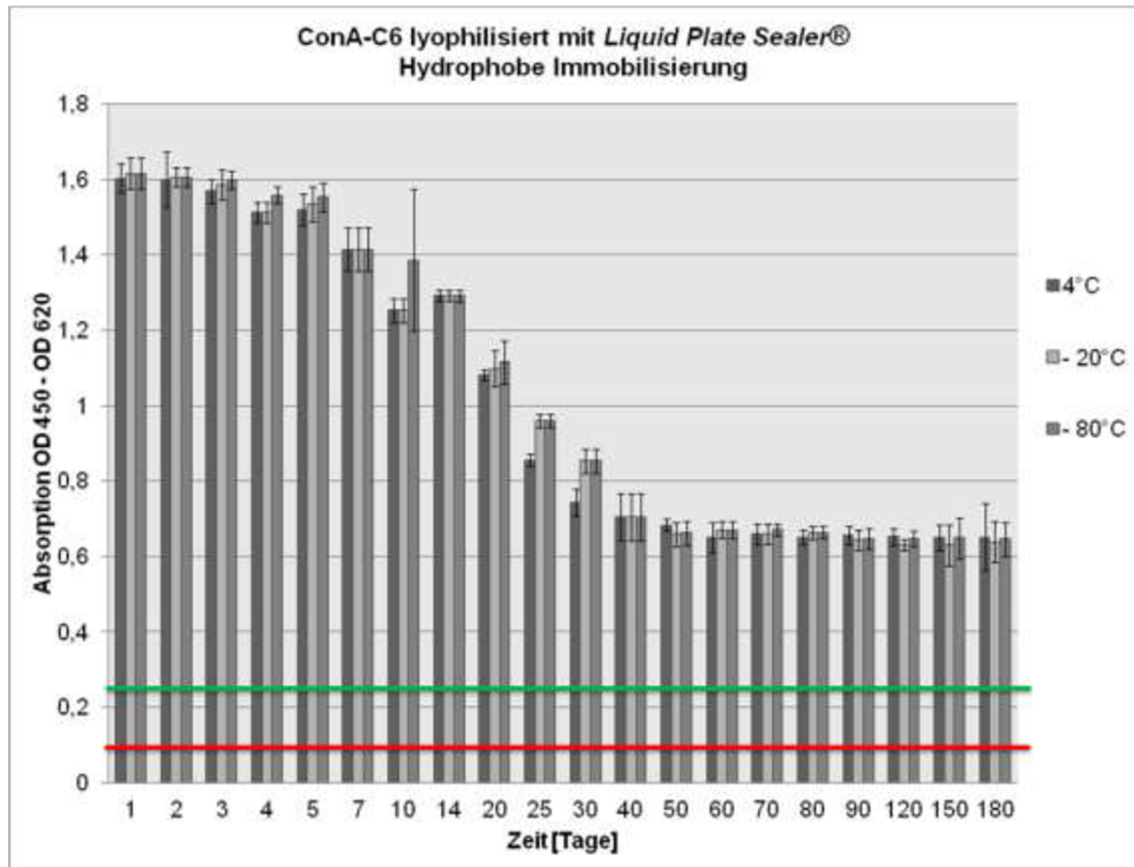


Abbildung 62: ELISA Messung von ConA-C6 mittels hydrophober Immobilisierung mit Zusatz von LPS bei Lyophilisierung. Dargestellt sind die Messergebnisse der verschiedenen Lagerungsbedingungen nach den jeweiligen Tagen. n=6

5.7.2.2 Mannanoberfläche

Die gleichen Messreihen, wie zuvor beschrieben, wurden ebenfalls auf mit Mannan funktionalisierten 96 Well Platten durchgeführt. Abbildung 63 zeigt den Messreihenverlauf von ConA-C6 ohne Zusätze bei der Lyophilisierung. Das Signal begann, wie auch schon in den Messreihen mit ConA-OspC auf Mannanoberfläche zu sehen war, bei einer Absorption unter 1, blieb aber für die ersten 4 Tage sehr stabil. Nach 4 Tagen begann ein stetiger Rückgang des Signals, wobei sich alle drei Lagerungsbedingungen in ihrem Verlauf ähnelten. Nach 70 Tagen Lagerung verlor sich das Signal im Hintergrundrauschen bei einem Wert um die 0,15 und verblieb auf diesem Niveau bis zum Anlauf der 180 Tage.

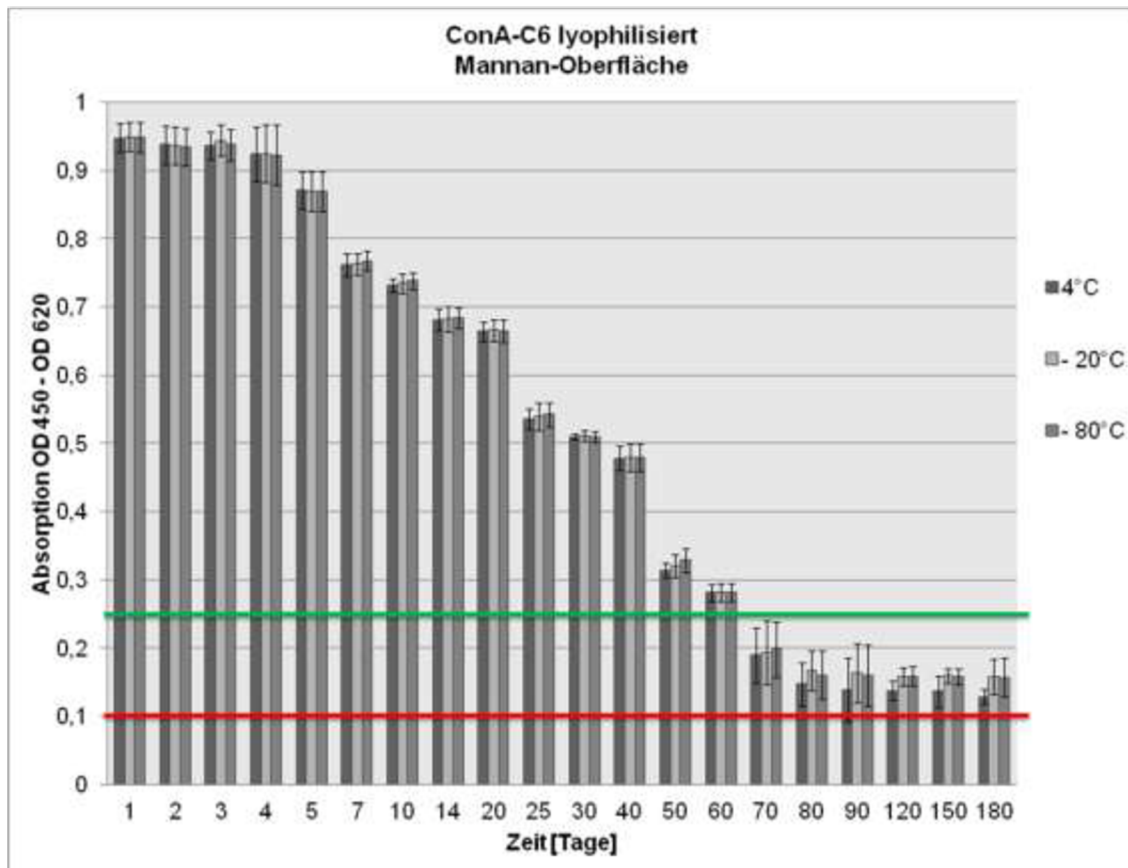


Abbildung 63: ELISA Messung von ConA-C6 auf Mannanoberfläche ohne Zusätze bei Lyophilisierung. Dargestellt sind die Messergebnisse der verschiedenen Lagerungsbedingungen nach den jeweiligen Tagen. n=6

Die unten stehende Abbildung 64 zeigt im Vergleich zur vorherigen Messreihe die Ergebnisse von ConA-C6 nach Zugabe von 10% Saccharose bei Lyophilisierung. Der Verlauf der Messreihe war vergleichbar zur vorherigen. Die Signalstärke betrug am Anfang um die 0,96 bei allen Lagerungsbedingungen und die ersten Tage stabil. Nach 4-5 Tagen war ein erster deutlicher Rückgang in der Signalhöhe erkennbar und nach 50 Tagen fielen letztendlich alle Lagerungsbedingungen in das Grundrauschen zurück. In dieser Messreihe war aber wiederum, im Vergleich zur Lyophilisierung ohne Zusätze zu bemerken, dass die Lagerung bei 4°C gleichwertig zu den anderen Temperaturen ausfiel. Dies konnte auch schon bei der hydrophoben Immobilisierung von ConA-C6 bei Zugabe von 10% Saccharose (Abb. 61) und LPS (Abb. 62) beobachtet werden. Bei den Versuchen mit ConA-OspC war eine solche Tendenz nur schwer zu erkennen, wenn überhaupt nur bei den Experimenten auf der Mannanoberfläche.

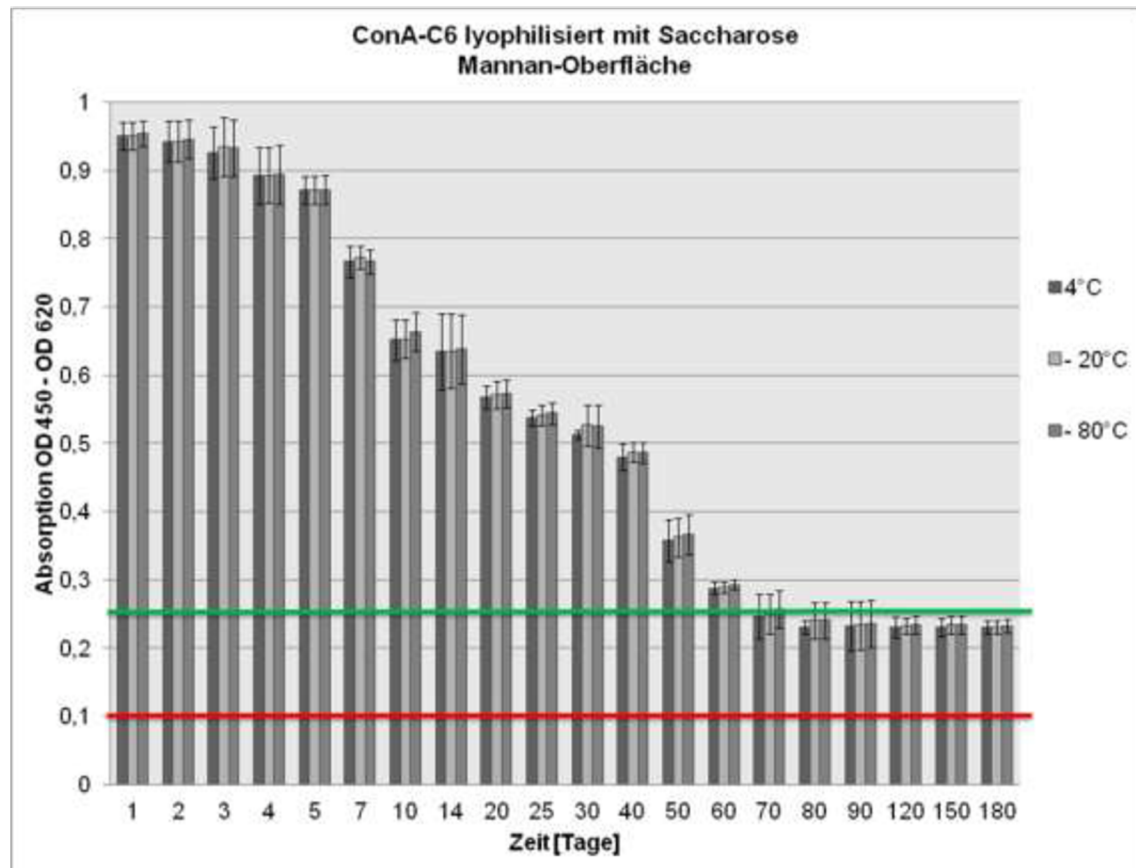


Abbildung 64: ELISA Messung von ConA-C6 auf Mannanoberfläche mit Zusatz von 10% Saccharose bei Lyophilisierung. Dargestellt sind die Messergebnisse der verschiedenen Lagerungsbedingungen nach den jeweiligen Tagen. n=6

Abbildung 65 zeigt die Ergebnisse die, mit dem LPS bei Lyophilisierung des ConA-C6 auf Mannanoberfläche erzielt wurden. Die Messreihe startete bei einer Signalstärke um die 0,96 und blieb die ersten Tage relativ stabil. Danach war bis zum Ablauf von 25 Tagen ein Rückgang im Signal zu beobachten, bis auf ein Niveau von 0,75. Im Anschluss blieb das Signal bis zum Ablauf der 180 Tage stabil auf diesem Niveau stehen und zeigte keine Tendenzen nach unten. Dieser positive Effekt konnte auch schon bei dem Langzeitexperiment von ConA-OspC auf Mannanoberfläche bei Lyophilisierung mit LPS (Abb. 59) beobachtet werden.

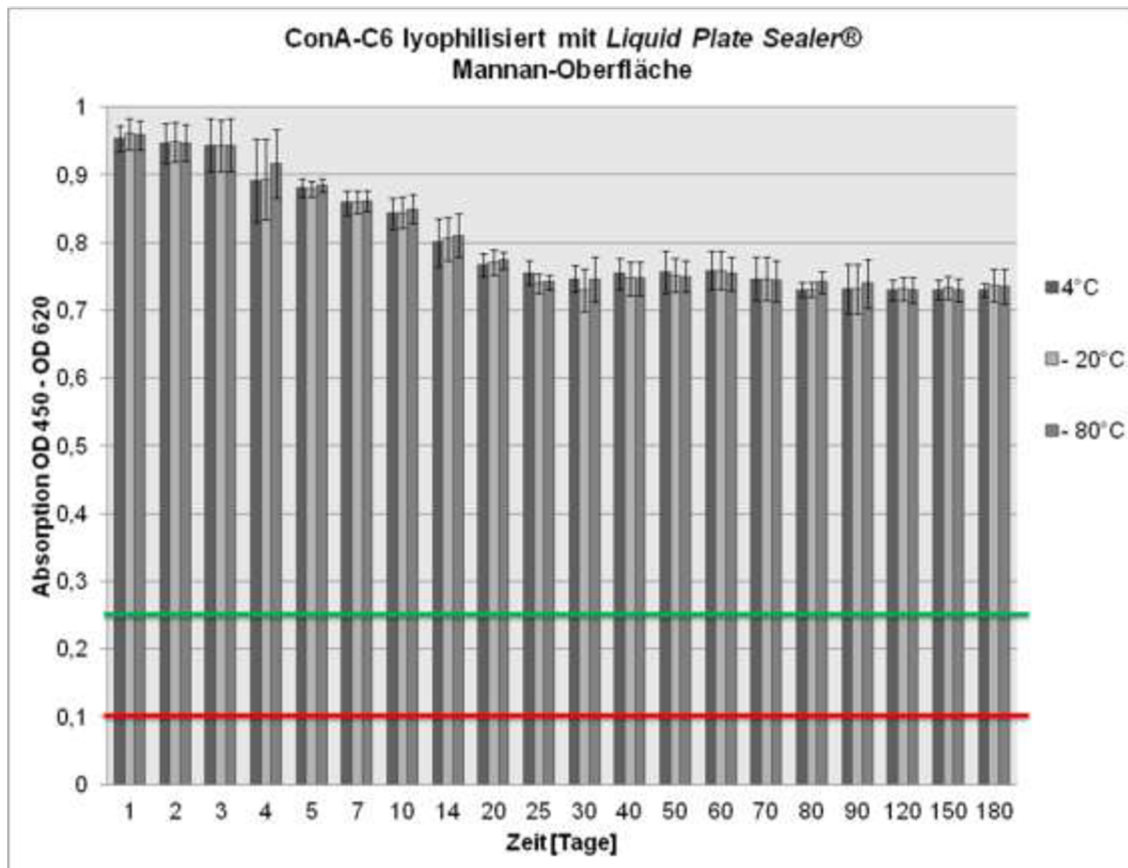


Abbildung 65: ELISA Messung von ConA-C6 auf Mannanoberfläche mit Zusatz von LPS bei Lyophilisierung. Dargestellt sind die Messergebnisse der verschiedenen Lagerungsbedingungen nach den jeweiligen Tagen. n=6

5.8 Detektion von fTLI im Blutserum mittels ConA-ProtA

5.8.1 Klonierungsstrategie, Gensequenzen, Restriktionsanalysen ConA-ProtA

Es wurde eine Fusion aus ProtA und pre-pro-ConA angestrebt, um darüber einen spezifischen fTLI Antikörper zielgerichtet auf einer Zuckeroberfläche oder wahlweise C-18 Oberfläche zu immobilisieren. Dieser universelle Linker sollte eine Anbindung verschiedener IgG Moleküle an Zucker- sowie C-18 Oberflächen ermöglichen, um den Einsatzbereich des Testsystems erheblich zu vergrößern.

ProtA bindet spezifisch den Fc-Teil von IgG Molekülen und beeinflusst damit nicht die Bindeeigenschaft zu den spezifischen Antigenen. Die Gensequenz des ProtA wurde von *Staphylococcus aureus* gewählt. Sie besteht aus 5 ähnlichen IgG-Bindedomänen, mit jeweils auf der Proteinebene zwei alpha-helikalen Bereichen. Innerhalb dieser Bereiche be-

findet sich der überwiegende Anteil der Aminosäuren, die für die Bindung an das IgG Molekül zuständig sind (Moks et al. 1986).

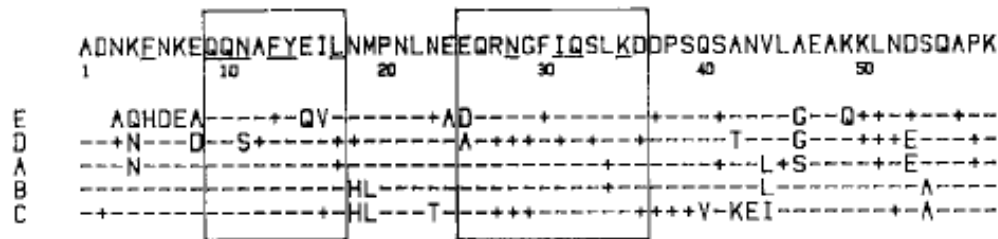


Abbildung 66: Zusammenstellung der 5 Protein A Fc-Bindedomänen sowie einer Protein A Konsensus-Sequenz nach Moks et al (1986). Identische Aminosäuren sind mit einem – gekennzeichnet, Stellen mit einer Mutation tragen ein +. Die Boxen verdeutlichen die alpha-helikalen Bereiche, welche sterisch für die Bindung des Fc-Fragments notwendig sind, wobei die unterstrichenen Aminosäuren direkt an der Bindung beteiligt sind.

In der obigen Abbildung 66 sind die fünf Domänen des ProtA in einem Alignment der Aminosäuren dargestellt. Die alpha-helikalen Bereiche sind umrahmt dargestellt. Innerhalb dieser befinden sich vermehrt, die für die Bindung verantwortlichen, Aminosäuren. Diese sind unterstrichen dargestellt. Im oberen Bereich findet man die Konsensus Sequenz der Aminosäuren. Diese Sequenz wurde in den Triplet Code überführt und für die Klonierung des Konstrukts ConA-ProtA verwendet. Sie besteht aus 174 Basenpaaren.

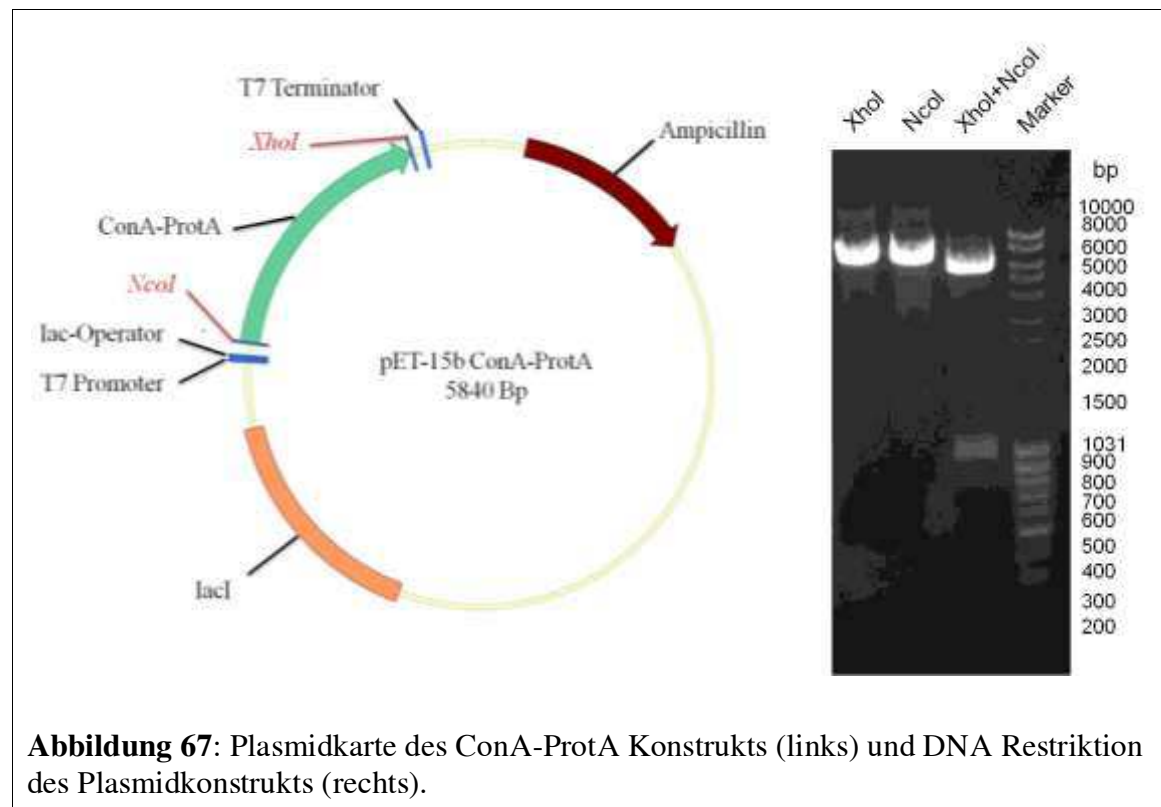


Abbildung 67: Plasmidkarte des ConA-ProtA Konstrukts (links) und DNA Restriktion des Plasmidkonstrukts (rechts).

Die cDNA-Sequenz des ProtA wurde mit der cDNA-Sequenz des pre-pro-ConA durch einen GS-Linker (siehe Kapitel 5.4.1) verbunden und in den pET-15b Vektor kloniert. Das Vektorfragment hatte eine Länge von 5666 Basenpaaren. Das Gesamtkonstrukt besaß somit eine Länge von 5840 Basenpaaren. Die Gensequenz wurde auf die Codon-Usage des *E. coli*-Expressionssystems angepasst, um eine effiziente Expression zu ermöglichen. Das His-Tag zur Proteinaufreinigung wurde nach sorgfältiger Überlegung nicht in Betracht gezogen, da man in Vorexperimenten erkannt hatte, dass es die dreidimensionale Struktur der ConA-Domäne verändern könnte, wodurch die Bindungseigenschaft in Mitteleidenschaft gezogen würde. Zudem wurde das Protein in Inclusion bodies exprimiert, wodurch eine speziell angepasste Inclusion body-Aufreinigung durchgeführt werden musste.

5.8.2 Expressionskinetik und Proteinaufreinigung von ConA-ProtA

Nach erfolgreicher Klonierung des Linkerproteins ProtA-ConA wurde eine Transformation in *E. coli* BL21 (DE3) durchgeführt, mit anschließender Expression. Es wurde eine Expressionskinetik über 12 h durchgeführt, um den richtigen Zeitpunkt für die Zellernte zu ermitteln. Die Zellen wurden hierzu in flüssigem LB Medium auf eine optische Dichte von 0,8 angezogen und mit IPTG die Proteinexpression induziert. Im Folgenden wurde anfangs jede Stunde eine Probe entnommen und mit fortschreitender Zeit alle 2 bis 4 Stunden. Die Proben wurden aufgearbeitet und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 68).

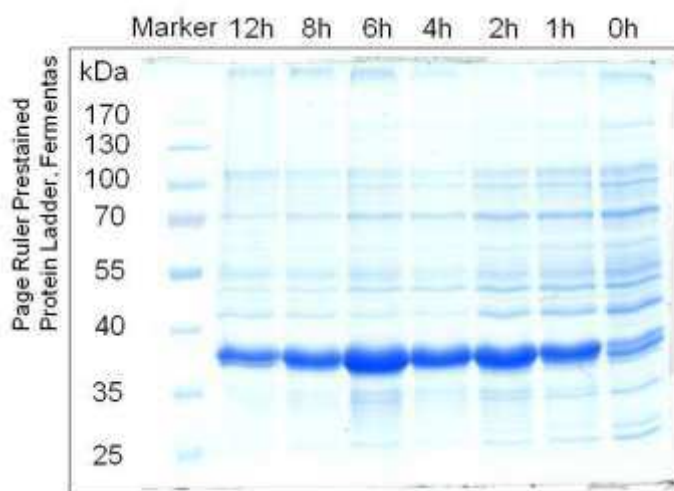


Abbildung 68: SDS-PAGE der Expressionskinetik für ProteinA-ConA in *E. coli* BL21 (DE3). Marker: Page-Ruler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific

Die Expressionskinetik ließ bereits vor Induktion mit IPTG eine Basalexpression erkennen, welche allerdings vernachlässigbar erschien. Man erkannte eine Stunde nach Induktion eine vermehrte Expression des Linkerproteins mit steigender Tendenz. Nach 6 h Expressionszeit begann sich das Protein wieder abzubauen. Aufgrund der Stärke der Expression des Linkerproteins, wurde eine Expressionszeit von 6 h nach IPTG-Zugabe für die weiteren Arbeiten ausgewählt.

Die folgende Abbildung 69 zeigt das Linkerprotein ConA-ProtA nach erfolgreicher Inclusion body-Aufreinigung auf einer SDS-PAGE. Nach Optimierung der Inclusion body-Aufreinigung war die Reinheit des gewonnen Proteins sehr gut; ConA-ProtA hatte ein Gewicht von 37 kDa, wie zuvor berechnet und zeigte nach der Aufreinigung nur sehr geringe Verunreinigungen

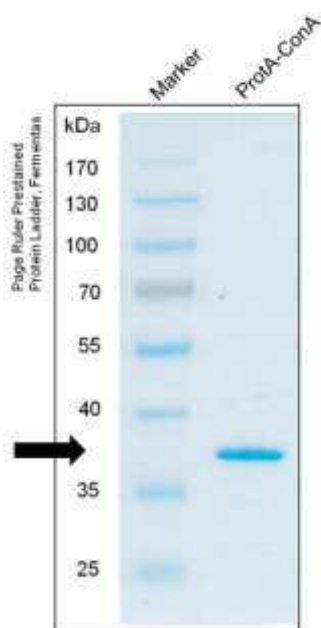


Abbildung 69: SDS-PAGE der aufgereinigten Proteinfraction des ProteinA-ConA. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific

5.8.3 Assay Modell ConA-ProtA

Die Fusion aus der ConA-Domäne und der ProtA Bindedomäne erlaubt die Bindung des Linkers auf einer mit Zucker funktionalisierten Oberfläche. Mithilfe dieser Oberfläche können beliebige Antikörper, sofern sie eine Affinität zu ProtA haben, auf der Oberfläche gerichtet immobilisiert werden (Abb. 70).

Eine hydroxylierte Oberfläche wird auf chemisch kovalentem Weg mit einem Zucker, z.B. Dextran oder Mannan, funktionalisiert (Schritt 1). Auf die Zuckeroberfläche wird das

Linkerprotein mittels der ConA-Domäne (Schritt 2) gebunden. Die Antikörper werden mittels der ProtA-Bindestelle auf dem Linkerprotein immobilisiert (Schritt 3), gefolgt von der Applikation des Analyten (Schritt 4). Nach der Detektion des Analyten kann die mit Zucker funktionalisierte Oberfläche durch Waschen mit Puffer wieder regeneriert werden, der 10% (w/v) Methyl α -D-Methylmannopyranose (Schritt 5) enthält. Der gesamte Komplex aus Linkerprotein, Antikörper und Analyt wird von der Oberfläche gewaschen und nach einem Spülschritt mit Puffer kann die Chipoberfläche erneut mit ConA-ProtA beladen werden.

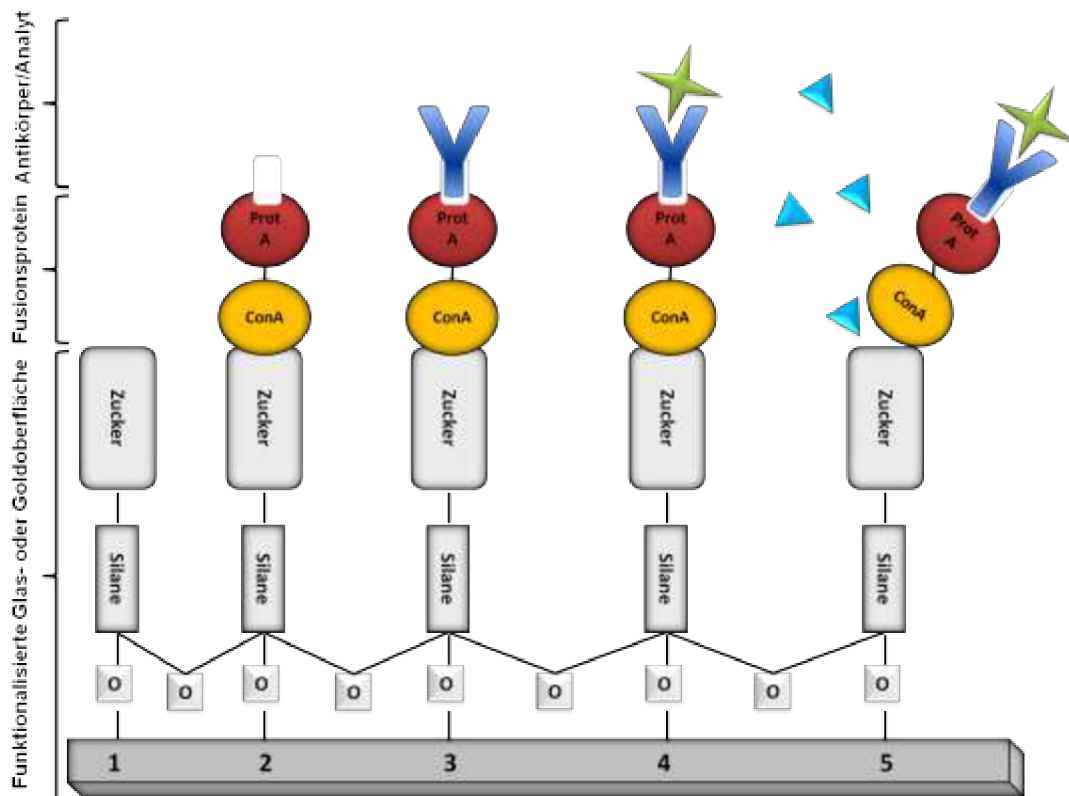


Abbildung 70: Konzept Assay ConA-ProtA- auf Zucker Oberfläche 1: mit Zucker funktionalisierte Oberfläche, 2: Anbindung des Linkerproteins ConA-ProtA, 3: Applikation des Antikörpers, 4: Detektion des Analyten, 5: Mögliche Regeneration der Oberfläche mit α -D-Methylmannopyranose.

5.8.4 Detektion von fTLI auf C-18 Oberfläche mittels Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie

Als Vorbereitung auf den fTLI Test mit Realproben wurde das Linkerprotein ConA-ProtA mittels eines Modell-Assays auf Funktionalität überprüft. Der Modell-Assay wurde mittels Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie durchgeführt. In diesem Modell-

Assay wurden BSA als Analyt und ein Antikörper gegen BSA verwendet. Dies stellte die kostengünstigste Methode dar, um den Assay als *Proof-of-Principle* durchzuführen. Das gleiche System wurde in abgeänderter Form auch für die Co-Immunopräzipitations Experimente des Linkerproteins ConA-SAv verwendet. In Abbildung 71 ist das Ergebnis mittels hydrophober Immobilisierung auf C-18-funktionalisierter Glasoberfläche zu sehen. Das rechte Sensorgramm in der Abbildung zeigt den Test mit Analyt, also die Positivkontrolle. Hierbei wurde das Linkerprotein auf die C-18-Oberfläche immobilisiert, gefolgt von einer Blockierung mit der BS und nach einem Spülschritt mit PBS-Puffer sowie anschließender Applikation eines spezifischen Antikörpers gegen BSA. Nach Applikation des Analyten BSA zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Signals. Im Kontrolllexperiment links, in dem Streptavidin anstelle des BSA injiziert wurde, war keine Erhöhung des Signals zu erkennen. Zudem wurde in einem Kontrolllexperiment sichergestellt, dass BSA nicht auf die Blockierungslösung selbst bindet sowie der anti-BSA Antikörper nicht auf die blockierte C-18-Oberfläche anheftet.

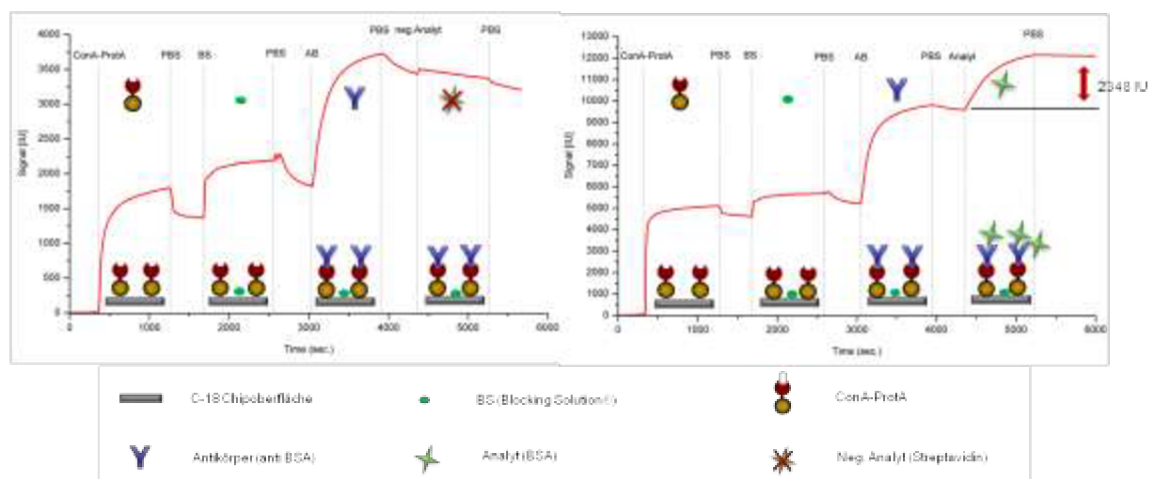


Abbildung 71: RfS-Sensorgramm. Modell-Assay auf C-18-Oberfläche. Rechtes Sensorgramm zeigt den positiven Testverlauf, das linke Sensorgramm das Kontrolllexperiment. Schritt 1: Applikation des Linkerproteins; Schritt 2: Blockierung mit BS; Schritt 3: Injektion des anti BSA-Antikörpers; Schritt 4: Applikation des Analyten BSA bzw. des negativen Analyten Streptavidin.

Somit zeigte dieser *Proof-of-Principle* ein gelungenes Experiment und der Modell-Assay wurde im weiteren Verlauf auf die Mannanoberfläche übertragen.

5.8.5 Detektion von fTLI auf Mannanoberfläche mittels Reflektometrischer Interferenz Spektroskopie

Das im vorherigen Kapitel beschriebene Experiment wurde nun auf einer Mannanoberfläche durchgeführt. In diesem Experiment wurde die Funktionalisierung der Oberfläche mit Mannan im Gerät durchgeführt (Kapitel 4.4.4.3), um eine möglichst frische Oberfläche für den Assay bereit stellen zu können. Aus Erfahrung waren die mit Mannan funktionalisierten Glasoberflächen leider nicht sehr stabil und lagerungsfähig, weshalb auf diese Lösung zurückgegriffen wurde. Nach der Funktionalisierung mit Mannan wurde die Oberfläche zuerst mit BS behandelt, um eventuelle Vakanzen auszugleichen und anschließend auf die Oberfläche das Linkerprotein ConA-ProtA appliziert. Nach Applikation des spezifischen Antikörpers auf das Linkerprotein wurde auch hier wieder der Analyt BSA/Streptavidin gegeben. In der Positivkontrolle mit BSA war eine signifikante Erhöhung des Signals nach Bindung des Analyten zu erkennen (rechtes Sensorgramm in Abbildung 72). Das linke Sensorgramm in Abbildung 72 zeigt das Kontrollexperiment mit dem nicht bindenden Analyten Streptavidin. Hier zeigte sich keine Erhöhung des Signals nach dessen Applikation. Auch hier wurden alle erforderlichen Kontrollexperiment durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Antikörper und Analyten nicht auf die blockierte Zuckeroberfläche banden.

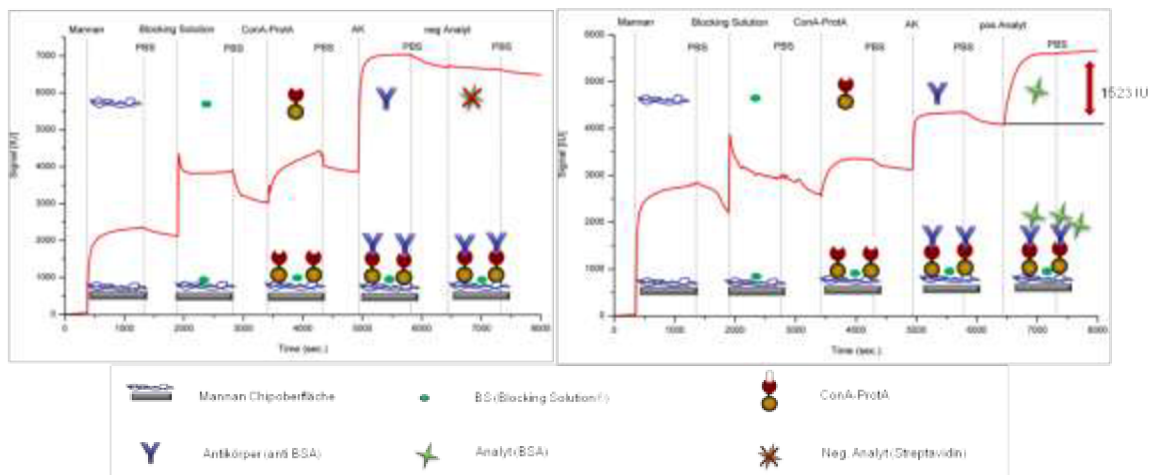


Abbildung 72: RfS-Sensorgramm. ConA-ProtA Modell-Assay auf Mannanoberfläche. Rechtes Sensorgramm zeigt den positiven Testverlauf, das linke Sensorgramm das Kontrollexperiment. Schritt 1: Etablierung der Mannanoberfläche; Schritt 2: Applikation des Linkerproteins; Schritt 3: Blockierung mit BS; Schritt 4: Injektion des anti BSA-Antikörpers; Schritt 5: Applikation des Analyten BSA bzw. des negativen Analyten Streptavidin.

Mittels dieses Modell-Assays konnte die Funktionsfähigkeit des Linkerproteins ConA-ProtA bestätigt werden. Die ConA-Domäne des Linkerproteins band spezifisch an die mit Zucker funktionalisierte Glasoberfläche und die Bindestelle des ProtA war nicht beeinträchtigt, wie die ausgeprägte Anbindung des Antikörpers an die Oberfläche bewiesen.

Im weiteren Verlauf wurde der Modell-Assay in abgewandelter Form, auf die SPR-Plattform übertragen, um letztendlich die Realproben zu testen und den Assay auf seine Tauglichkeit mit Realproben in der *Point-of-Care* Diagnostik zu untersuchen.

5.8.6 Detektion von fTLI auf Mannanoberfläche mittels Oberflächen Plasmon Resonanz

Zu Anfang der Versuchsreihen wurde der auf RIfS etablierte Testassay (siehe Kapitel 5.8.5), mit BSA als Analyten, auch auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche getestet (Abb. 73).

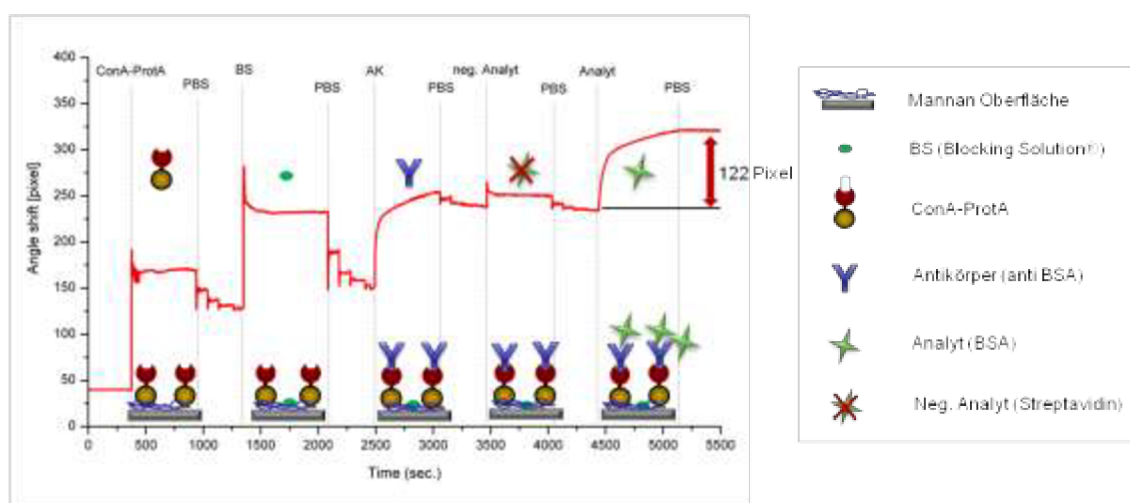


Abbildung 73: SPR-Sensorgramm. ConA-ProtA Modell-Assay auf Mannanoberfläche. Sensorgramm zeigt den positiven Testverlauf mit internem Kontrollversuch. Schritt 1: Applikation des Linkerproteins Schritt 2: Blockierung mit BS; Schritt 3: Injektion des anti BSA-Antikörpers; Schritt 4: Applikation des negativen Analyten Streptavidin; Schritt 5: Applikation des Analyten BSA.

Hierzu wurden nach Aufnahme einer Basislinie das Linkerprotein auf die Mannanoberfläche gebunden und anschließend wurden eventuelle Vakanzen mit der BS ausgeglichen. Im Anschluss erfolgte die Applikation des Antikörpers anti-BSA und nach einem kurzen Spülschritt erfolgte die Zugabe des „falschen“ Analyten Streptavidin zur Kontrolle. Die-

ser zeigte nach den Waschschritten keinerlei Anbindung auf der Oberfläche. Das Signal blieb auf dem gleichen Level wie vor der Zugabe von Streptavidin. Danach erfolgte die Zugabe des „richtigen“ Analyten BSA. Bei Zugabe von BSA wurde eine spezifische Anbindungskurve sichtbar und das Signal blieb auch über mehrere Waschschriffe stabil.

Nach erfolgreicher Testung des Modell-Assays wurde das Testsystem auf die fTLI Komponenten übertragen. Um die einzelnen Komponenten zu testen, wurden zuerst Messungen mit aufgereinigtem fTLI-Antigen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 74 dargestellt.

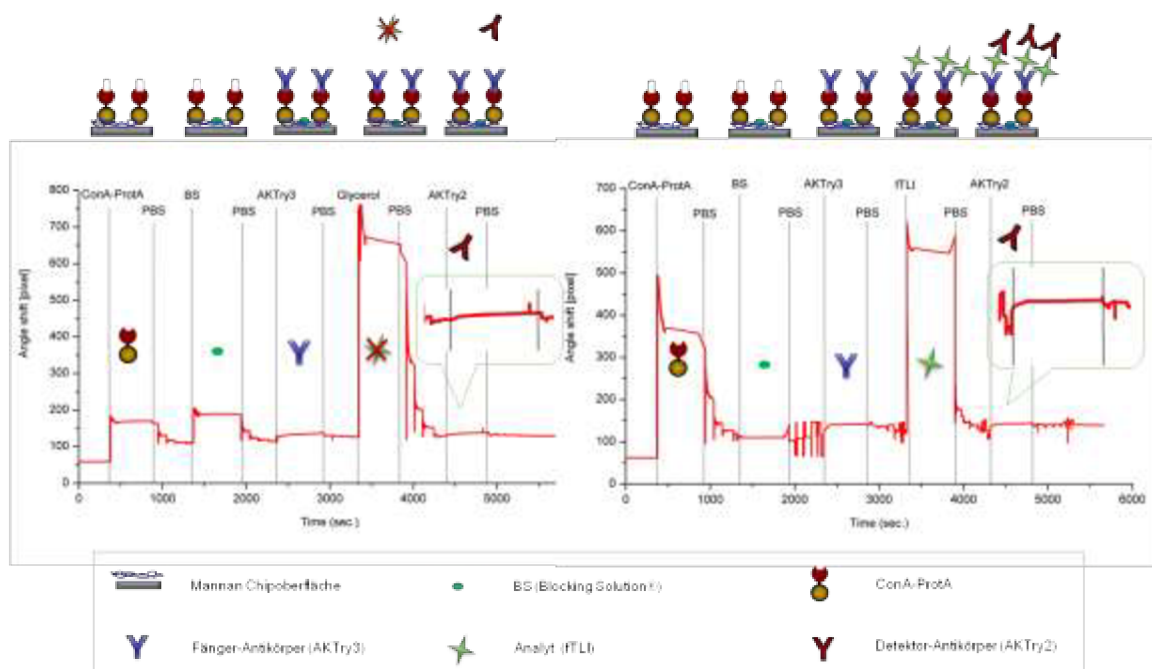


Abbildung 74: SPR-Sensorgramme für fTLI Assay. Grundaufbau des Assay-Verlaufs: Schritt 1: Applikation des ConA-ProtA auf die Mannanoberfläche; Schritt 2: Blockierung der Vakanzen mit BS; Schritt 3: Injektion des Fängerantikörpers (AKTry3); Schritt 4: Applikation des Antigens fTLI (rechts) bzw. 25% Glycerol für Kontrollexperiment (links); Schritt 5: Injektion des Detektorantikörpers (AKTry2).

Das Sensorgramm, rechts in der Abbildung, zeigt den Assay-Verlauf mit bei Zugabe des Antigens fTLI und das Sensorgramm links zeigt das Kontrollexperiment der Messung mit 25% Glycerol, anstelle von fTLI. Diese Konzentration ergab sich aufgrund dessen, dass das aufgereinigte fTLI-Antigen, welches uns zu Verfügung gestellt wurde, in einer Lösung mit 50% Glycerol gelagert wurde. Das fTLI Antigen war sehr instabil und fiel bei geringeren Glycerol Konzentrationen aus. Daher konnte nur auf eine Verdünnung von

25% Glycerol in Puffer zurückgegriffen werden. Zudem war vorauszusehen, dass die hohe Glycerolkonzentration das Sensorsignal extrem stark beeinflussen würde, was den Einsatz eines abschließenden Detektionsantikörpers nötig machte. Beide Messungen wurden mit dem gleichen Programmablauf durchgeführt.

Zuerst erfolgte die Applikation von ConA-ProtA auf die Oberfläche. Diese Anbindung wies bei beiden Messungen ein Nettosignal von ca. 50 Pixeln auf. Im Anschluss wurde die Oberfläche mit BS behandelt. Anschließend erfolgte die spezifische Anbindung von Fängerantikörper (AKTry3) an das Linkerprotein, mit einem Nettosignal von jeweils 10 Pixeln. Der nächste Schritt war die Zugabe des fTLI-Antigens bzw. der Glycerol-Lösung. Im Kontrollexperiment wurde ein Gemisch aus Glycerol und PBS-Puffer appliziert. Dieses Gemisch ahmte die Lösungsbedingung des Antigens nach und konnte eventuelle Wirkungen von Glycerol auf die Oberfläche erkenntlich machen, sofern sie vorlagen. Da, wie schon angemerkt, diese hohe Konzentration von Glycerol das SPR Signal sehr stark beeinflusste, musste die anschließende Detektion über einen zweiten Antikörper erfolgen. Dieser Detektionsantikörper (AKTry2) wurde in beiden Fällen zum Schluss appliziert um die Bindung des fTLI nachzuweisen. Im rechten Sensorgramm erkennt man eine klare Anbindungskurve des Detektionsantikörpers und ein spezifisches Nettosignal von 15 Pixeln. Im Kontrollexperiment links ergab der Detektionsantikörper keine spezifische Bindungskurve, sondern eine unspezifische Anbindung die auch als Sedimentationsverhalten gedeutet werden könnte. Dieses Sediment wurde in den folgenden Waschschritten wieder abgebaut und es war kein Nettosignal mehr zu ermitteln. Eine Übersicht ist in Tabelle 35 dargestellt.

Tabelle 35: Messdaten der SPR-Sensorgramme für fTLI Assay n=1

	ConA-ProtA	BS	AKTry3	fTLI/Glycerol	AKTry2
Nettosignal für Messung mit fTLI [Pixel]	46	0	23	6	20
Nettosignal für Kontrollmessung [Pixel]	50	5	25	4	0

5.8.7 Detektion von fTLI in Real-Proben mittels Oberflächen Plasmon Resonanz

Nach Etablierung des Assays mit gereinigtem fTLI, wurden Messungen mit Realproben durchgeführt. Diese Realproben wurden von der Firma Laboklin zur Verfügung gestellt. Die Serumproben enthielten fTLI-Antigen in bekannter Konzentration und konnten für eine Kalibrierung des Assays verwendet werden. Der Assay Ablauf erfolgte wie im Kapitel zuvor, um vergleichbare Messergebnisse zu erhalten. Zuerst wurde auf die Mannanoberfläche das Linkerprotein gebunden, im Anschluss erfolgte ein Blockierungsschritt mit anschließender Applikation des Fängerantikörpers. Nun erfolgte, in mehreren Messreihen, die Applikation der Serumprobe in den bekannten Konzentrationen. Es wurden mehrere Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von fTLI-Antigen in Serum durchgeführt. Danach wurde eine Kalibriergerade mit folgenden Messdaten erstellt:

Tabelle 36: Normierung der Signale für fTLI Assay. n=1

Serum	AkTry3 Signal [Pixel]	Serum Signal [Pixel]	Normiertes Signal	Gehalt an fTLI in ng/ml
S41225	41	14	0,34	7,7
S38177	30	13	0,43	53,2
S39330	38	23	0,60	120

Zu Normierung des Signals wurden die Werte der Anbindung des Serums durch den jeweiligen Wert des Signals der Antikörperbindung des Fängerantikörpers geteilt. Die normierten Werte sind in einem Diagramm in Abbildung 75 dargestellt.

Aufgetragen ist auf der Y-Achse die normierte Signalthöhe, nach abgeschlossener Dissoziation des Serums, gegen die Gesamtkonzentration von fTLI-Antigen in ng/ml. Die Normierung erfolgte auf die Nettosignalanbindungshöhe des Fängerantikörpers vor Applikation jeweiligen des Serums. Die Messungen wurden mit Serum-Verdünnungen von 1:100 in PBS-Puffer durchgeführt. Um einen Überblick über das Verhalten des Signals zu erhalten, wurden Proben ausgewählt, die das gesamte Spektrum an Konzentration von fTLI-Antigen im Serum abdeckten. Zur Darstellung einer Pankreasinsuffizienz wurde eine Probe mit einer Konzentration von 7,7 ng/ml gewählt. Im Normalbereich lag die mittlere Probe mit einer Konzentration von 53,2 ng/ml und zur Darstellung einer akuten Pankreatitis wurde die höchste Konzentration einer Probe mit 120 ng/ml herangezogen. Aus

diesem Werten ergab sich eine Dreipunktkalibrierung mit einem R^2 von 0,9959. Diese Kalibriergerade bildete die Grundlage für weitere Messungen.

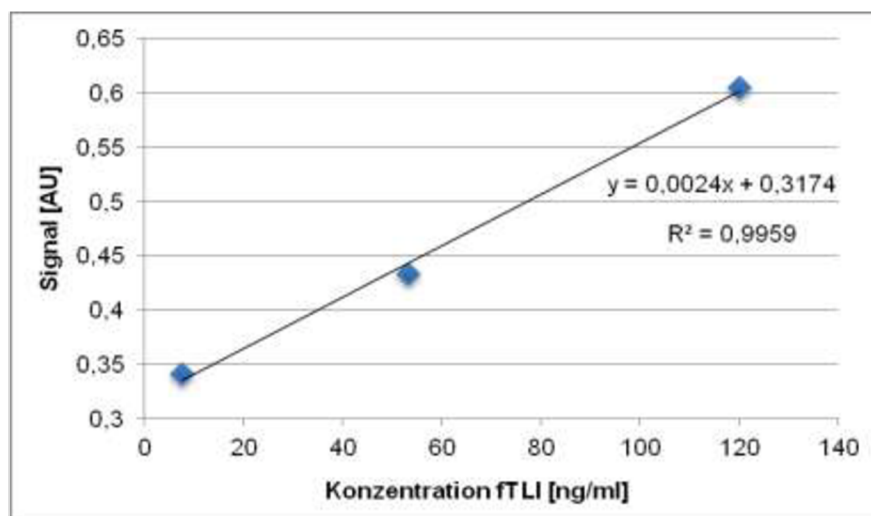


Abbildung 75: Diagramm einer Kalibrationsgeraden mit bekannten fTLI Realproben. Die erhaltenen Signale nach Bindung des Serums an die mit Linkerprotein bestückte Oberfläche sind aufgetragen nach der totalen Menge von fTLI-Antigen im Serum. Die Serumproben wurden vor der Messung 1:100 in PBS-Puffer verdünnt. n=1

5.8.8 Immunologische Detektion von fTLI auf 3D-Polysinterkörpern

Der fTLI Testassay konnte erfolgreich von der planaren Oberfläche auf die 3D Polymer-sinterkörper übertragen werden. Um den Assay auf den 3D Sinterkörpern zu etablieren, wurden *Proof-of-Principle* Messungen mit aufgereinigtem fTLI-Antigen durchgeführt. Die Messungen wurden auf einer mit Mannan funktionalisierten sowie auf einer hydrophoben Polyethylenoberfläche durchgeführt. Wie auch auf der planaren Oberfläche diente eine Mischung aus Glycerol und PBS-Puffer als Negativkontrolle. Die Messungen wurden als Triplikat angefertigt, um falsch positive oder negative Messungen auszuschließen. In Abbildung 76 ist die optische Auswertung der Messungen zu sehen. Der exakte Ablauf der Messungen ist im Methodenteil beschrieben (Kapitel 4.4.3).



Abbildung 76: ABICAP[®] Messungen (*Proof-of-Principle*) mit gereinigtem fTLI-Antigen. Linke Abbildung: hydrophobe Immobilisierung des ConA-ProtA; rechte Abbildung: Immobilisierung des ConA-ProtA auf Mannanoberfläche.

Wie in der Abbildung 76 zu sehen ist, ist der *Proof-of-Principle* erfolgreich verlaufen. Man konnte gut zwischen einer positiven und negativen Probe unterscheiden. Die Kontrollinterkörper zeigten kaum eine Färbung, was auf einen geringen Hintergrund in der Messmethode zurückzuführen war. Zudem funktionierte das Assay Setup sowohl auf einer hydrophoben, als auch auf einer mit Mannan funktionalisierten Polyethylenoberfläche.

Im folgenden Schritt wurde der Assay auf die Realproben angewendet und auch hier wurde eine Kalibriergerade erstellt:

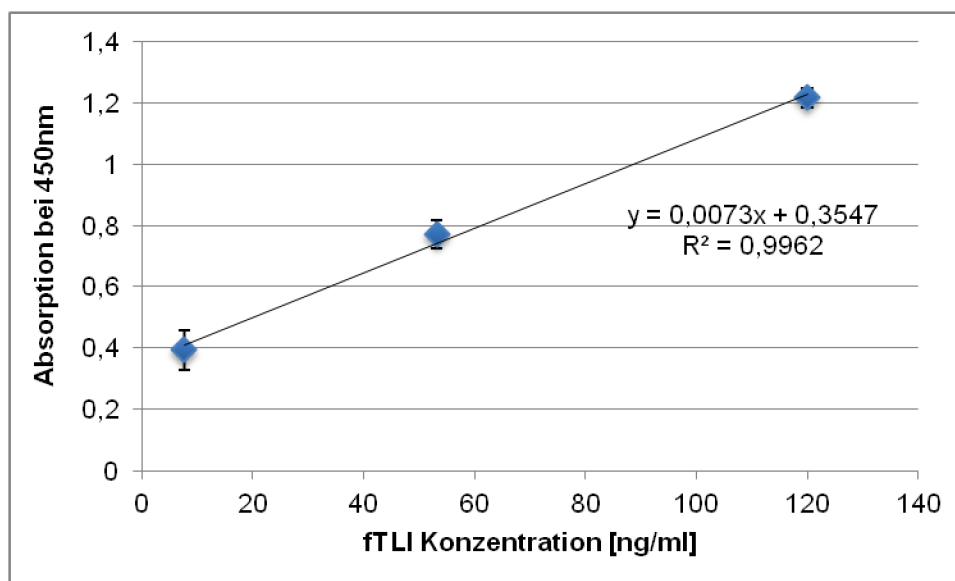


Abbildung 77: Diagramm einer Kalibrationsgeraden mit bekannten fTLI Realproben auf Mannanoberfläche. Die erhaltenen Signale nach Streulichtmessung im ABICAP® Photometer von Senova sind aufgetragen nach der totalen Menge von fTLI im Serum. Die Serum Proben wurden vor der Messung 1:100 in PBS-Puffer verdünnt. n=3

Die genauen Messwerte sind der unten stehenden Tabelle 37 zu entnehmen:

Tabelle 37: Messdaten der Kalibriergeraden auf 3D-Polymersinterkörpern mit fTLI Realproben n=3

Probe	Gemessene Absorption bei 450 nm					Konzentration fTLI in ng/ml
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert	Stabw	
S14225	0,457	0,328	0,396	0,394	0,064	7,7
S38177	0,825	0,757	0,734	0,772	0,047	53,2
S39330	1,194	1,208	1,254	1,218	0,031	120

Die Kalibriergerade wurde durch die Messung weiterer Proben mit bekannter Konzentration überprüft. Die gemessenen Werte wurden zur besseren Übersicht graphisch zusammengefasst (Abb.78). Da nur weitere Proben im Bereich von 8 bis 25 ng/ml zur Verfügung standen, konnte nur dieser Bereich weiter untersucht werden. Für den Bereich von 50 bis 120 ng/ml fTLI-Antigen standen leider keine weiteren Proben zur Verfügung.

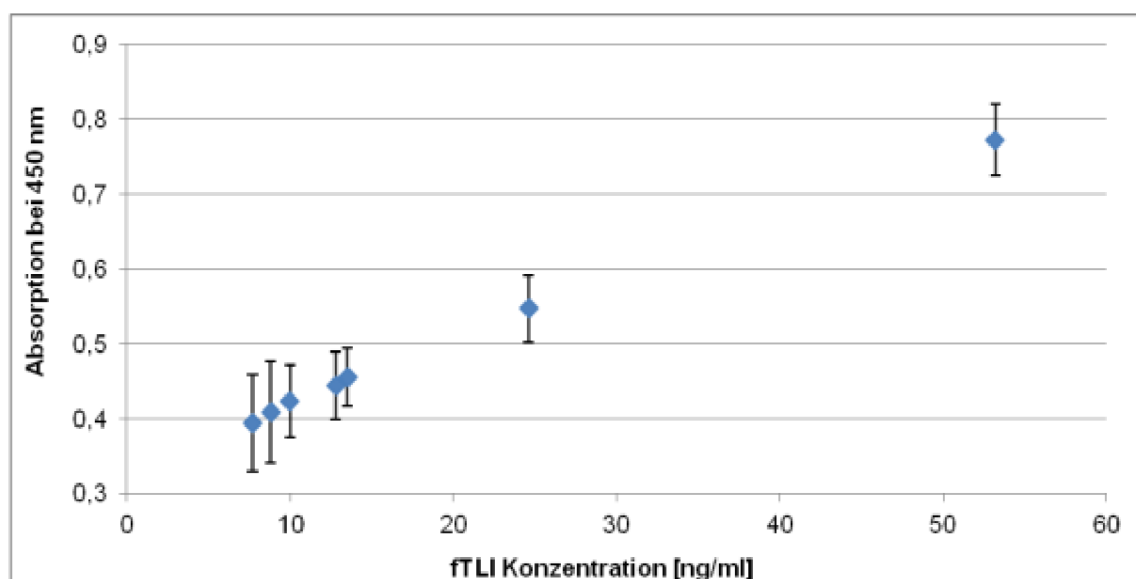


Abbildung 78: Diagramm einer Messreihe mit unbekannten fTLI Realproben auf Man-
nanoberfläche. Die erhaltenen Signale nach Streulichtmessung im ABICAP[®] Photometer
von Senova sind aufgetragen nach der totalen Menge von fTLI im Serum. Die Serum
Proben wurden vor der Messung 1:100 in PBS-Puffer verdünnt. n=3

Anhand der Formel für die Kalibriergerade konnten nun die ermittelten und die tatsächlichen Werte der fTLI Realproben errechnet und gegenübergestellt werden. Hierzu musste der Mittelwert der gemessenen Absorption als y in die Gleichung eingesetzt werden, um nach x aufzulösen. Die gemessenen Mittelwerte und die tatsächlichen Werte wurden in Tabelle 38 zusammengefasst. Im Zuge des Vergleichs der ermittelten und der bekannten Konzentrationen von fTLI-Antigen im Serum, wurde zudem deren Abweichung in Prozent ermittelt.

Tabelle 38: Messdaten der 3D-Polysinterkörper mit fTLI Realproben n=3

Probe	Gemessene Absorption (Mittelwert)	Ermittelte Konzentration von fTLI [ng/ml]	Tatsächliche Konzentration von fTLI [ng/ml]	Abweichung [%]
S41225	0,393	Kalibriergerade	7,7	entfällt
S41648	0,408	7,4	8,85	-16,38
S37462	0,423	9,35	10	-6,5
S39325	0,444	12,23	12,8	-4,45

S42611	0,455	13,7	13,5	+1,48
S37666	0,546	26,2	24,6	+6,5
S38177	0,772	Kalibriergerade	53,2	entfällt

Die obige Tabelle, nach aufsteigender fTLI Konzentration sortiert, gibt den Mittelwert der gemessenen Konzentration für die jeweilige Probe und den daraus ermittelten Wert für die Konzentration an fTLI-Antigen, im Vergleich zu der Konzentration fTLI-Antigen, die von der Firma Laboklin durch Western blot ermittelt wurde, als Referenz. Zuletzt wurde die Abweichung der ermittelten und der mitgeteilten Konzentrationen in Prozent angegeben. Die beiden Randwerte waren die Werte aus der Kalibriergerade, die Werte dazwischen sind neue Proben. Probe S41648 wies als einzige eine Abweichung über 10 Prozent auf. Die restlichen Proben zeigten nur eine geringe Abweichung von ca. 1,5 bis maximal 6,5 Prozent. Die genauen Messwerte für die Ermittlung der Mittelwerte können im Anhang Kapitel 10.6 Tabelle 43 eingesehen werden.

5.9 Untersuchung der Glasoberflächenfunktionalisierung mittels Rasterkraftmikroskopie

Die AFM-Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Eyas Dayyoub und Dr. Jens Schäfer (Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Philipps-Universität Marburg) anfertigt. Nach einem erfolgreich durchgeführten RfS Experiment wurde ein mit Dextran behandelter Glaschip vorsichtig aus dem Gerät entnommen und für die AFM Messungen verwendet.

In Abbildung 79 ist in Teil a) eine unfunktionalisierte Glasoberfläche abgebildet. Aufgrund der Produktionsmethoden war diese Oberfläche sehr rau. Nach der Funktionalisierung mit Dextran hingegen erkannte man eine signifikant glattere Oberfläche (b, d)). Diese zeigte eine RMS Rauigkeit von 0,499 nm und eine Oberflächenrauigkeit von (R_a) von 0,383 nm für einen Scanbereich von 5 μm x 5 μm . Die ermittelten Werte der AFM Aufnahmen sind in der unten stehenden Tabelle nochmals zusammengefasst.

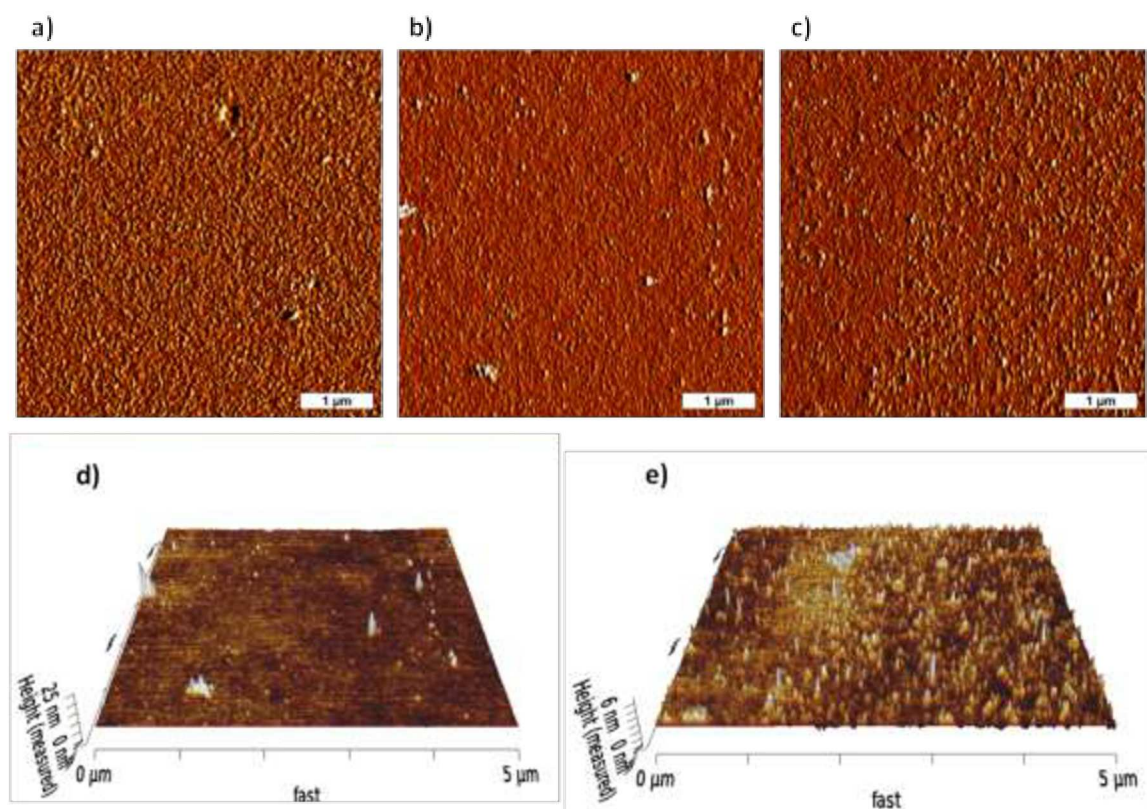


Abbildung 79: AFM Aufnahmen der unfunktionalisierten sowie mit Dextran funktionalisierten Glasoberfläche

Die Abbildungen 79 c) und e) zeigen die Chipoberfläche nach Beladung mit dem ConA-SAv Linkerprotein. Die einzelnen sphärischen Punkte könnten Moleküle des Linkerproteins darstellen. Dies ließ vermuten, dass die Oberfläche nur punktuell mit Linkerprotein belegt war. Unter Berücksichtigung, dass das Protein nur als ein Linker für biotinylierte Biomoleküle interagieren sollten, könnte diese punktuelle Belegung der Oberfläche sogar einen Vorteil darstellen, da die Zugänglichkeit der Streptavidin-Bindedomäne in diesem Fall eher gewährleistet ist, als es bei einer vollständigen Belegung der Oberfläche der Fall wäre. Aus diesem Grund ist eine unvollständige Belegung der Oberfläche mit Linkerprotein zu favorisieren.

Tabelle 39: Ergebnisse der AFM Messungen auf Dextranoberfläche

Type of surface	RMS (nm)	R _a (nm)	Scanned area (μm)
Surface b), d)	0,499	0,383	5 * 5
Surface c), e)	0,694	0,349	5 * 5

Bezüglich der AFM Messungen ist zu bemerken, dass die RMS Rauigkeit durch die Beladung mit ConA-SAv auf 0,694 nm stieg und die Oberflächen Rauigkeit (R_a) 0,349 nm betrug.

6 Diskussion

6.1 Auswahl des Blockierungsreagenzes

Bei Verwendung eines Blockierungsreagenzes mit unspezifischen Bindeeigenschaften, könnte eine Bindeaktivität des Analyten überdeckt oder nicht spezifisch zugeordnet werden. Im Vorfeld wurden daher viele Experimente mit verschiedenen Blockierungsreagenzien durchgeführt. Vor allem BSA in Konzentrationen von 1-2 mg/ml, danach Tween20[®] als 2%ige Lösung in PBS-Puffer und zuletzt die kommerziellen Produkte, wie die BS oder den *Smart Block*[®] von Candor Bioscience. Hierbei hat sich herausgestellt, dass es kein universelles Blockierungsreagenz für alle Anwendungen zu geben scheint. Jeder dieser Ansätze zeigt Vor- sowie auch Nachteile. Insbesondere hatte BSA den großen Nachteil unspezifische Interaktionen mit dem Serum einzugehen, wodurch es für die Experimente der Borreliosedagnostik sowie für die Detektion von fTLI-Antigen in Serum aus-schied. Zudem wurde BSA als kostengünstiger Analyt für die Modell-Assays in Betracht gezogen, was den Einsatz von BSA als Blockierung natürlich ausschloss.

Tween20[®] findet sehr oft im Laboralltag bei der Behandlung von Western blots Verwendung. Es dient als Detergenz zum Abspülen der unspezifisch gebundenen Antikörper auf der Membran und hat zudem noch eine Blockierungsfunktion, sodass bei der nächsten Applikation möglichst keine Antikörper unspezifisch anhaften können. In Kombination mit der Biosensorik stellte sich dieses Verhalten leider als sehr negativ heraus, da die Chipoberfläche durch das Tween20[®] im Laufe der Zeit immer mehr in Mitleidenschaft gezogen wurde. Eine Degeneration der Oberfläche machte sich durch eine starke Drift im Signal erkennbar, was auf einen Abbau der Oberfläche hindeutet und die Messungen unbrauchbar werden ließ.

In der Biosensorik stellten sich vor allem die BS und der *Smart Block*[®] sehr gut dar. In Kapitel 5.3 Abbildung 35 ist das Kontrollexperiment für die BS zu sehen. Hierbei wurde eine Mannanoberfläche mit der Blockierungslösung behandelt und anschließend Serum appliziert. Nach den jeweiligen Spülschritten war kein Anbindungssignal mehr detektierbar. Somit zeigten Serum und BS keinerlei unspezifische Interaktion. Aus diesem Grund wurde die BS für alle weiteren Versuche in diesem Forschungsprojekt verwendet.

Zudem ist zu bemerken, dass die Blockierung der Oberfläche mit Bedacht eingesetzt werden sollte. Eine übermäßige Blockierung führte aus Erfahrung in den meisten Fällen zu einer Verfälschung des Signals. Um dies zu vermeiden wurden im Projektverlauf die Inkubationszeiten sowie Waschschritte immer wieder angepasst und variiert, um die jeweiligen Bindungspartner im Analyseablauf nicht zu stören oder im schlimmsten Fall eine Bindung zu behindern. Diese optimierten Abläufe sind im Methodenteil dargestellt.

6.2 ConA-SAv

Die Expression sowie die Aufreinigung des Linkerproteins ConA-SAv verliefen erfolgreich. Nachdem festgestellt wurde, dass das Protein nach Expression innerhalb der Zellen in Inclusion bodies gelagert wurde, konnte die vorher geplante Aufreinigung des Proteins im Zelllysat über das His-Tag mittels Nickel NTA-Säule nicht mehr erfolgen. Nun stellte sich die Frage, warum das Linkerprotein während der Expression in Inclusion bodies gelagert wurde. Allgemein kann die Bildung von Inclusion bodies bei Überexpression von Proteinen in Bakterien vorkommen. Im Fall des Concanavalin A, oder besser gesagt des pre-pro-Concanavalin A, welches zur Klonierung verwendet worden war, wurde diese Problematik bereits seit der Jahrtausendwende in der Literatur diskutiert (Dincturk, Dunn und Jones 2001). Hier wurde bereits festgestellt, dass bei alleiniger Expression des pre-pro-ConA die Bildung von Inclusion bodies erfolgt. Das Protein ist stabil, allerdings von sehr geringer Löslichkeit. Dieser Fakt wird sich auch auf die Linkerproteine ausgewirkt haben. Durch die geringe Löslichkeit des pre-pro-ConA, wurde der gesamte Anteil des exprimierten Linkerproteins in Inclusion bodies zusammengeschlossen. Der Grund zur Verwendung des pre-pro-ConA, im Gegensatz zur gereiften Form des Concanavalin A die eventuell eine bessere Löslichkeit aufgewiesen hätte, lag in dessen vermehrten Ausbildung in Di- und Tetrameren Strukturen. Um dies zu verhindern, wurde die pre-pro-ConA Form verwendet, da vermutet wurde, dass sich sonst Probleme in der Oberflächenstruktur der Biosensorchips ergeben würden. Durch eine Quervernetzung der ConA-Komponenten hätte es zu einer Art Netzstruktur kommen können, welche die Regenerationsfähigkeit der Oberfläche negativ beeinflussen könnte. Gegen die Verwendung des pre-pro-ConA bestanden keine Einwände da, wie bereits in Kapitel 1.2.1 erwähnt, die precursor-Form in ihrer Funktionalität der gereiften Form in nichts nachsteht und zudem keine Neigung aufweist Di- oder Tetramere Strukturen zu bilden (Min et al., 1992).

Letztendlich konnte das Linkerprotein ConA-SAv erfolgreich durch eine Inclusion body Aufreinigung aus den Zellen gewonnen werden und dies mit einer sehr guten Reinheit von über 90%. Das wurde auch über einen Western blot (Abb. 22, Kap.: 5.2.2) bestätigt. Hier konnte ein gutes Signal auf Höhe des Linkerproteins nachgewiesen werden. Zudem waren kleinere Fragmente auf dem Western blot sichtbar, die Abbauprodukte des Proteins durch die Lagerung bei -20°C in Puffer darstellen können. Anhand der SDS-PAGE erkennt man jedoch, wie gering konzentriert diese Fragmente sind und daher vernachlässigbar scheinen.

6.2.1 Co-Immunopräzipitation

In der Co-Immunopräzipitation (Abb. 24 Kap.: 5.2.4) wurde die volle Funktionsfähigkeit des Proteins bestätigt. Die ConA-Domäne hat, wie erwartet, an die Dextranoberfläche gebunden und der Streptavidin-Teil band den biotinylierten Antikörper. Die Anbindung des Analyten war ebenfalls erfolgreich und die Regeneration des gesamten Komplexes aus Linkerprotein, biotinyliertem Antikörper und Analyten von der Dextran Matrix der Sephadex® G-25 Beads war erfolgreich.

6.2.2 Bindungsstudien mittels Biosensor

Die ersten Versuche wurden mittels RfS durchgeführt. Hierzu wurden mit Dextran funktionalisierte Glasoberflächen verwendet, um die Oberfläche und die Eigenschaften der Sephadex® G-25 Beads nachzuahmen. In Abbildung 25 Kapitel 5.2.5 ist eines der ersten Experimente zu sehen, die auf einer Dextranoberfläche durchgeführt wurden. Hier ist die Regenerationsfähigkeit des ConA-SAv Linkerproteins von der Oberfläche demonstriert. Es war möglich, das Protein auf die Dextranoberfläche zu binden und anschließend mit dem konkurrierenden Zucker wieder abzulösen, um darauf hin die Oberfläche wieder mit Protein neu belegen zu können. Dieses Experiment zeigt sehr bildlich die Grundidee des Forschungsvorhabens. Eine regenerative Oberfläche, die es ermöglicht Biosensorchips mehrfach zu verwenden sowie die Übertragung auf die 3D-Polymersinterkörperstruktur, die die Anreicherung eines Analyten ermöglichen soll. In den weiterführenden Experimenten, in dem die Bindung des Linkerproteins zu einem Modell-Assay ausgebaut wurde, ergaben sich jedoch neue Problemstellungen. Abbildung 26 zeigt den Ablauf des etab-

lierten Modell-Assays. Auf eine blockierte Dextranoberfläche wurde das Linkerprotein gebunden. Daraufhin erfolgte die Anbindung des biotinylierten Antikörpers. Dessen deutliche Anbindung zeigt, dass auch bei Einsatz auf einer 2-dimensionalen Oberfläche die Streptavidin Bindedomäne aktiv ist. Im Anschluss wurde der Analyt appliziert. Dieser zeigte ebenfalls eine deutliche Anbindungskurve. Dieses Ergebnis ist bis dahin sehr positiv zu werten, da es beweist, dass der Sandwich-Aufbau des Assays funktioniert. Im Anschluss sollte die Regeneration mit dem konkurrierenden Zucker erfolgen. Leider ließ sich auf dieser Oberfläche keine Ablösung des Komplexes hervorrufen. Das Signal zeigte nur einen kurzen Anstieg durch den erhöhten Brechungsindex, um daraufhin wieder auf das Niveau bei Anbindung des Analyten zu sinken. Auch weitere Experimente mit längeren Spülzeiten oder höheren Konzentrationen des konkurrierenden Zuckers, konnten keine Regeneration der Oberfläche hervorrufen.

Um auszuschließen, dass die fehlerhafte Regenerationsfähigkeit nicht ein Problem ist welches die RIfS betrifft, wurde die SPR als alternative Messmethode hinzugezogen. Hierbei ist wichtig, dass sich zwischen den beiden Methoden auch ein grundlegend unterschiedlicher Aufbau des Gerätes ergibt. RIfS arbeitet mit einer Fluidik, ähnlich einer FPLC, wodurch die Lösungen innerhalb des Messkanals über die Oberfläche strömen und somit vielleicht nicht die Möglichkeit haben, längere Interaktionszeiten einzugehen, wie es für eine komplette Regeneration nötig wäre. Der Aufbau des SPR Gerätes liegt einem Küvettensystem zu Grunde. Dieses Küvettensystem ist statisch im Gegensatz zum Durchflussmodell des RIfS. In Kombination mit dem Einsatz des Pipettierroboters können verschiedenste Methoden angewendet werden, die die Oberfläche direkt von oben spülen und damit „aufwühlen“, um eine eventuelle Regeneration zu begünstigen.

Der Modell-Assay wurde somit auf die Gold-Oberfläche des SPR Systems übertragen. Abbildung 27 (Kapitel 5.2.6) zeigt das Ergebnis einer Messung, die auf Mannanoberfläche durchgeführt wurde. Es zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der RIfS-Methode, mit einem interessanten Unterschied. Die Oberfläche erbrachte ebenfalls eine gute Anbindung des Linkerproteins mit anschließender Bindung des biotinylierten Antikörpers. Um ausschließen zu können, dass der Analyt die Regenerationsfähigkeit verhindert, wurde auf diesen verzichtet. Daher erfolgte direkt im Anschluss die Applikation der Regenerationslösung mit dem konkurrierenden Zucker. Dennoch zeigte sich keine Regeneration der Oberfläche. Das Signal zeigte zuerst einen kurzen Anstieg durch die Veränderung des Brechungsindex, sank aber anschließend nur auf das Niveau der Anbindung des Antikör-

pers zurück. Um auch in diesem Experiment ausschließen zu können, dass das Linkerprotein irreversibel an die blockierte Mannanoberfläche gebunden hat, wurde ein Kontroll-experiment hierzu durchgeführt (Abb. 28). Dieses Kontrollexperiment bestätigte, dass keine unspezifische Interaktion zwischen blockierter Mannanoberfläche und Linkerprotein bestand. Dies lies mehrere Schlussfolgerungen zu: Die Regeneration könnte entweder sterisch behindert sein, durch den immer größer werdenden Schichtaufbau, wodurch die α -D-Methylmannopyranose-Lösung kaum noch die Möglichkeit hat an die Oberfläche zu dringen, um das Linkerprotein von der Zuckeroberfläche zu lösen. Ein Hinweis auf dieses Phänomen ist die Tatsache, dass die Regeneration des gesamten Komplexes im Fall der Co-IP sehr gut funktioniert. Die Sephadex Matrix ist eine gelartige Struktur, wodurch die α -D-Methylmannopyranose durch die Gelmatrix hindurch besser an die Oberfläche vordringen kann. Das ist auf der planaren Oberfläche der Glaschips nicht möglich. Zum anderen könnte die Bindung des biotinylierten Antikörpers eine gravierende Konformationsänderung der ConA-Bindetasche zur Folge haben, wodurch die Bindeeigenschaften des Proteins verändert werden könnten. Um dieses Phänomen explizit nachzuweisen, müssten Kristallstrukturen mit und ohne gebundenem Biotin aufgenommen werden. Da eine Kristallisation zeitintensiv ist und dieses Forschungsvorhaben nicht darauf ausgelegt war, wurden alternative Methoden angegangen, welche sich für sich für den weiteren Fortgang der Arbeit ebenfalls als nützlich erwiesen.

Zuerst sollte eine Optimierung der Assay-Bedingungen erfolgen. Hierunter fielen Verbesserungen im Bereich des pH-Wertes, der Spülgeschwindigkeiten und der Einsatz von Detergenzien, um eine 100%tige Regeneration zu ermöglichen. Das Linkerprotein konnte bei Verwendung von 2% Tween 20 in der α -D-Methylmannopyranose-Lösung mit gebundenem Antikörper bis zu ca. 20% wieder von der Oberfläche gelöst werden. Allerdings waren diese Ergebnisse nicht konstant reproduzierbar und manchmal war sogar keinerlei Regeneration bei gleichem Assay Aufbau möglich (Abb. 29, Kapitel 5.2.7). Der Einsatz eines erniedrigten pH-Wertes hatte keinen Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit des Linkerproteins. Trotz dieses negativen Ergebnisses ist das ein Hinweis darauf, dass eine Dimerisierung oder Tetramerisierung nicht die Ursache für die fehlende Regenerationsfähigkeit sein kann.

Zum anderen wurden verschiedene Zuckeroberflächen mit Alternativen, wie z.B. Chitosan angestrebt, wobei die Funktionalisierungen auf die jeweiligen Zucker angepasst werden mussten. Dieser Aspekt war Teil der Masterarbeit von Frau Svenja Weigel in der

Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Keusgen. Leider ließ sich auch hier bis zuletzt keine 100%ige Regeneration der Chipoberfläche erzielen.

Zudem ist die Wahl der Linkersequenz innerhalb des Fusionsproteins nicht zu vernachlässigen. Flexible Linker, welche oft reich an kleinen Aminosäuren wie Gly und Ser sind, fördern die strukturelle Flexibilität. In Fällen, wo eine stabile Separation der Domänen erfolgen muss, werden starre Linkersequenzen bevorzugt. Durch ihre meist α -helikale Struktur, können diese Linker beide Domänen effektiv auseinander halten. Zusammenfassend kann man sagen, dass verschiedene Linker die diversen Funktionen der Proteine fördern, aber auch hindern können (Chen, Zaro, Shen 2013). Unter diesem Aspekt könnte eine Optimierung der Linkersequenzen in den Fusions- und Linkerproteinen erfolgen. Hierzu wäre eine strukturelle Aufklärung hilfreich, um den Effekt der verschiedenen Linker zu erforschen.

Ein weiteres Feld waren Mutagenesen innerhalb der ConA-Bindetasche, um die Bindungseigenschaften zu verändern. Es ist möglich, dass durch die Anbindung des biotinylierten Antikörpers, die intramolekulare Struktur des ConA-SAv Proteins auf eine Weise verändert wurde, der die Regenerationsfähigkeit des Proteins stark beeinflusst hat.

6.2.3 Mutanten des ConA-SAv Linkerproteins

6.2.3.1 D90N

Die Mutante D90N wurde erfolgreich mittels PCR und speziellen Primern hergestellt. Nach Expression und Inclusion body-Aufreinigung wurde das Linkerprotein mittels SPR Technologie auf seine Funktionalität getestet.

Das SPR-Sensorgramm in Abbildung 33 (Kapitel 5.2.8.1) verdeutlicht die Bindungseigenschaften des Proteins. Es wurde versucht D90N auf eine Mannanoberfläche zu binden, doch im Sensorgramm ist keine Anbindung des Proteins an die Oberfläche zu ermitteln. Um auszuschließen, dass die Mannanoberfläche selbst fehlerhaft war, wurde das Linkerprotein ConA-SAv appliziert. Dieses zeigte eine positive Anbindung auf die Mannanoberfläche und konnte auch mittels Regenerationslösung wieder von der Oberfläche abgelöst werden. Diese Ergebnisse waren auch auf anderen Goldoberflächen reproduzierbar und ließen nur den Schluss zu, dass die Mutation innerhalb der Bindetasche des ConA, zu einem absoluten Funktionsverlust der D90N Mutante geführt haben muss.

Bei dieser Mutante wurde die Asparaginsäure an Position 90 durch Asparagin ersetzt. Beide Aminosäuren haben eine ähnliche Struktur, mit Ausnahme am C4 Atom. Dort besitzt die Asparaginsäure eine OH-Gruppe, im Gegensatz zur Aminogruppe des Asparagins. Asparaginsäure hat daher einen sauren Charakter, Asparagin hingegen ist neutral. Um den genauen Grund zu erfahren, warum diese Mutation einen Funktionsverlust hervorgerufen hat, würde man eine dreidimensionale Strukturaufklärung benötigen. So bleibt es nur Spekulation, dass die Umformung einer sauren Aminosäure zu einer neutralen, ein zu starker Wechsel war. Vielleicht wäre eine andere Mutation günstiger gewesen.

6.2.3.2 R110K

Die Mutante R110K wurde erfolgreich mittels PCR und speziellen Primern hergestellt. Nach Expression und Inclusion body-Aufreinigung wurde auch diese Mutante des Linkerprotein ConA-SAv mittels SPR Technologie auf ihre Funktionalität getestet.

Abbildung 34 in Kapitel 5.2.8.2 zeigt das SPR-Sensorgramm auf einer mit Mannan funktionalisierten Goldoberfläche. Zuerst erfolgte ein Blockierungsschritt mit anschließender Applikation des R110K Linkerproteins. Die bisherigen Messungen ließen keine genauen Interpretationen zu. Das Protein zeigte eine extrem geringe, bis gar keine, Anbindung an die Mannanoberfläche. Meist befanden sich die Anbindungssignale im Grundrauschen und waren somit nicht aussagekräftig.

Die Mutation des Arginins zu Lysin an Position 110 scheint einen Effekt auf die Bindungseigenschaften des Proteins gehabt zu haben. Bis jetzt steht nicht fest, ob die Bindungseigenschaft verloren gegangen ist, oder ob sie nur abgeschwächt wurde. Weitere Experimente auf anderen Zuckeroberflächen könnten vielleicht Aufschluss darüber geben, ob nur die Affinität zu Mannan so stark verändert wurde und ob sich im Zuge dessen vielleicht andere Zuckerverbindungen als sinnvollere Alternative herausstellen könnten. Diese Versuche könnten Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

Aufgrund der vielen Unwägbarkeiten, die die Mutagenese mit sich bringt, ohne Interpretationsmöglichkeit anhand einer Strukturaufklärung, wurden die Arbeiten an den mutierten Linkerproteinen zurückgestellt.

Zudem rückte im Verlauf der Arbeit die Fähigkeit zur Regeneration der Oberfläche mehr in den Hintergrund und es stellte sich heraus, dass die ConA-Domäne nicht nur zur Im-

mobilisierung auf Zuckeroberflächen Einsatz finden konnte, sondern auch für die gerichtete Immobilisierung der Proteine auf C-18-Oberflächen geeignet war. Zudem drang in den weiteren Arbeiten eine Verbesserung der Nachweisgrenze spezifischer immunologischer Nachweisverfahren, auf zwei- und dreidimensionalen Oberflächen, in den Vordergrund. Im Zuge eines Drittmittelprojektes wurde daher die Detektion von Borreliose mithilfe von Fusionsproteinen im Blutserum forciert. Durch die gerichtete Immobilisierung des Antigens auf den jeweiligen Oberflächen sollte eine Verbesserung der Nachweisgrenze, der zu detektierenden Antikörper aus Blutserum, erfolgen.

6.3 Detektion von Lyme-Borreliose im Blutserum

6.3.1 Borreliose Assay mit ConA-OspC

Das Fusionsprotein ConA-OspC konnte erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden. In Kapitel 5.4.2 Abbildung 39 ist das Ergebnis der Inclusion body-Aufreinigung dargestellt. Das Protein zeigt eine molekulare Masse von 56 kDa wie vorausberechnet, hat aber nur eine Reinheit von ca. 85%. Dies konnte auch durch eine Anpassung der Inclusion body-Aufreinigung nicht positiv beeinflusst werden. Hierzu wurden die Reinigungsschritte mehrmals hintereinander durchgeführt, um die Reinheit des Inclusion body-Pellets zu steigern. Da sich die Verunreinigungen trotz dessen nicht minimieren ließen, ist davon auszugehen, dass diese Proteine ebenfalls zusammen mit dem Fusionsprotein ConA-OspC in den Inclusion bodies angereichert werden und im Zuge dessen mit aufgereinigt werden.

6.3.1.1 Biosensormessungen

Wie bereits im vorherigen Kapitel 6.2.3.2 erwähnt, erwies sich die ConA-Domäne nicht nur zur Immobilisierung auf Zuckeroberflächen, sondern auch zur Immobilisierung auf C-18-Oberflächen, als nützlich. Daher wurden in den folgenden Teilprojekten dieser Arbeit die Messungen nicht nur auf Zuckeroberflächen, sondern auch auf C-18-Oberflächen angewendet. Die C-18-Funktionalisierung bietet zudem den Vorteil, dass sie mit einem geringeren Zeitaufwand verbunden ist sowie insgesamt meist höhere Signalstärken hervorbringt. C-18-Oberflächen sind zudem, sofern sie korrekt gelagert werden, sehr stabil und können auch Monate später noch verwendet werden. Im Fall der Mannanoberflächen

waren die Prismen bei Lagerungszeiten bis zu einem Monat brauchbar, jedoch bei längeren Lagerungszeiten wurden die Oberflächen zunehmend instabil, was sich in einem Drift des Signals sowie unbrauchbarer Plasmonen äußerte.

Abbildung 41 zeigt ein SPR-Sensorgramm durchgeführt auf einer C-18-funktionalisierten Goldoberfläche. Hierbei wurde zuerst die Oberfläche mit Fusionsprotein belegt und im Anschluss blockiert. Danach wurden zuerst zwei anti-OspC negative Seren appliziert. Nach der Dissoziation des ersten negativen Serums zeigte sich ein leichter Rückgang von 17 Pixeln im Signal, was darauf zurückzuführen sein kann, dass im Vorfeld die Blockierungslösung noch nicht ganz dissoziiert war. Nach Applikation und Dissoziation des zweiten negativen Serums sank das Signal wieder auf den erwarteten Ursprungswert. Nachdem dadurch geklärt wurde, dass keine unspezifische Anbindung eines negativen Serums erfolgte, wurde das Vollbildserum Hd3 appliziert. Nach Dissoziation blieb ein positives Signal von 25 Pixeln übrig. Dieses Signal lag 10-fach über dem Wert des Grundrauschens und konnte ohne weiteres als signifikant eingestuft werden. Mit diesem Experiment konnte die Funktionsfähigkeit des Fusionsproteins, zumindest auf C-18-Oberfläche, bestätigt werden.

Im Anschluss daran erfolgte die Übertragung des Assays auf die Mannanoberfläche (Abb. 42). Hier wurden zwei separate Messläufe durchgeführt, die aber in ihrem Ablauf identisch waren. Auch hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie auf der C-18-Oberfläche zuvor. In beiden Fällen verlief die Anbindung des Fusionsproteins erfolgreich auf eine vergleichbar hohe Signalstärke von 135 und 124 Pixeln. Nach Blockierung wurden auch hier wieder ein anti-OspC negatives und ein anti-OspC positives Serum (Hd3) appliziert. Die Anbindung des positiven Serums war auch hier um ein 10-faches höher, als die des negativen Serums. Dieses zeigte eine leichte Anbindung in einem Bereich nur minimal über dem Grundrauschen. Somit ist auch dieses Experiment als erfolgreich zu werten.

Im Vergleich der Messungen fiel auf, dass die Anbindung des Fusionsproteins auf der C-18-Oberfläche insgesamt mit 110 Pixeln wesentlich höher ausfiel, als im Vergleich zur Mannanoberfläche mit 81 bzw. 75 Pixeln. Dieser Effekt konnte auch bei den Proteinen ConA-C6 und ConA-ProtA im Vergleich der beiden Oberflächen beobachtet werden. Dieses Phänomen wird in Kapitel 6.5 weiter diskutiert.

Zudem fiel auf, dass die Anbindung des Vollbildserums im Fall der Mannanoberfläche höher ausfiel, als im Vergleich zur Messung auf C-18-Oberfläche. Auf der C-18 Oberflä-

che konnte bei Anbindung des Fusionsproteins in Höhe von 110 Pixeln eine Anbindung des Vollbildserums mit 25 Pixeln registriert werden. Auf der Mannanoberfläche zeigte sich ein anderes Bild. Hier verzeichnete die Immobilisierung von ConA-C6 ein Signal von 81/75 Pixeln, aber die Anbindung des gleichen Serums, wie im anderen Versuch, in exakt gleicher Konzentration, eine Höhe von 30 Pixeln. Dies deutete auf eine bessere Ausbeute der funktionalen Domänen des Fusionsproteins auf Zuckeroberflächen hin. Diese Beobachtung wird in Kapitel 6.3.3 gemeinsam mit den Ergebnissen weiter diskutiert, die mit dem Fusionsprotein ConA-C6 in diesem Zusammenhang erhalten wurden.

Als Referenzmethode wurden Messungen mit RIfS auf Mannanoberfläche herangezogen. Hierzu wurden wieder zwei unabhängige Messungen durchgeführt (Abb. 43). Der Chip wurde in beiden Fällen zuerst mit Blockierungslösung behandelt, um daraufhin das Fusionsprotein zu applizieren. Nun erfolgte im einen Fall die Injektion und Anbindung des anti-OspC positiven Serums bzw. die Injektion des anti-OspC negativen Serums. Im Fall des positiven Serums konnte eine Anbindung von 185 IU detektiert werden, im Fall des negativen Serums fiel das Signal in der Dissoziationsphase wieder auf den Ursprungswert zurück. Zur Kontrolle wurde eine Messung durchgeführt, in der das anti-OspC positive Vollbildserum Hd3, welches auch für die vorherige positive Messung verwendet worden war, auf einer blockierten Mannanoberfläche injiziert wurde. Hier zeigte sich nach Dissoziationsphase keine unspezifische Anbindung. Das bedeutete im Umkehrschluss, dass die vorherigen Messungen aus Abbildung 43 spezifische Ergebnisse zeigten. Somit konnten auch die Ergebnisse, die mit SPR erzielt wurden, nochmals untermauert werden. Das Fusionsprotein ConA-OspC ließ sich auf einer Mannan- sowie einer C-18-Oberfläche immobilisieren und zeigte bei Verwendung der anti-OspC positiven Seren einen spezifischen Anstieg im Signal. Somit konnte die volle Funktionsfähigkeit des ConA-OspC bewiesen werden.

6.3.2 Borreliose Assay mit ConA-C6

Nach intensiver Literaturrecherche wurde das Epitop 6 (Liang et al, 2000) der variablen Domäne des VlsE Oberflächenproteins für die Klonierung verwendet. Grundüberlegung dazu war es, ein möglichst kleines aber effektives Fusionsprotein zu erstellen. Durch die Erfahrung mit den vorher erfolgten Klonierungen von Proteinen in Volllänge, wurde im Nachhinein die Problematik in der Rückfaltung und Stabilisierung ein Thema. Die großen

Proteine mit über 50 kDa, neigten bei der Rückfaltung in hohem Maße dazu auszufallen und ein unbrauchbares, denaturiertes Sediment zu bilden. Eine Denaturierung während des Rückfaltungsprozesses, nach der Inclusion body-Aufreinigung, wird vermutlich mit einer sehr komplexen, dreidimensionalen Faltung in Zusammenhang stehen. Wenn diese Faltung nicht erfolgreich verläuft, fällt das Protein aus. Auch schien die Lagerung dadurch stark negativ beeinflusst zu werden. Selbst nach Rückfaltung und Lagerung bei -20°C war eine fortschreitende Sedimentation zu bemerken. Diese Beobachtungen führten zu der Idee, kein Volllängenprotein zu nehmen, sondern nach spezifischen Epitopen zu suchen, die ebenfalls eine signifikante Anbindung zulassen.

Das Fusionsprotein ConA-C6 konnte erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden. In Kapitel 5.5.2 Abbildung 48 ist das Ergebnis der Inclusion body-Aufreinigung dargestellt. Das Protein zeigt eine molekulare Masse von ca. 35 kDa, wie vorausberechnet und besitzt eine Reinheit von ca. 95%.

6.3.2.1 Biosensormessungen

Ebenso wie in Falle des ConA-OspC wurden auch hier zunächst SPR-Messungen auf C-18-Oberfläche durchgeführt. Diese Messungen sind in Abbildung 50 dargestellt. Sie fanden auf zwei separaten Kanälen statt, aber mit jeweils identischer Versuchsdurchführung. Nach Immobilisierung des ConA-C6 auf die C-18-Oberfläche fand die Blockierung statt. Im Anschluss wurde anti-VlsE positives, bzw. negatives Serum appliziert. Im Fall des positiven Serums ergab sich nach Dissoziation eine Anbindung von 45 Pixeln, im Fall des negativen Serums konnte keine Anbindung detektiert werden. Dieser Versuch bestätigte die Funktionsfähigkeit der C6 Domäne. Um die Funktionsfähigkeit der ConA-Domäne zu untersuchen, wurden Messungen auf Mannanoberfläche durchgeführt. Diese sind in Abbildung 51 dargestellt. Sie wurden ebenfalls in zwei separaten Kanälen durchgeführt mit jeweils gleichem Methodenablauf. Auch hier fand eine positive Anbindung des Vollbildserums Hd3 an das ConA-C6 Protein statt. Die Messung mit anti-VlsE negativem Serum fiel, wie erwartet, ohne eine Anbindung des Serums aus. Somit konnte in diesem Experiment auch die Funktionalität der ConA-Domäne, in Form der Bindung an die Mannanoberfläche, bestätigt werden.

Im Vergleich der Messungen untereinander fällt auf, dass die Anbindung des Vollbildserums im Fall der Mannanoberfläche sogar höher ausfiel, als im Vergleich zur Messung

auf C-18-Oberfläche. Auf der C-18-Oberfläche konnte eine Anbindung des Fusionsproteins in Höhe von 147/138 Pixeln registriert werden. Im Anschluss erfolgte die Anbindung des Vollbildserums mit 45 Pixeln. Auf der Mannanoberfläche zeigte sich ein anderes Bild. Hier verzeichnete die Anbindung von ConA-C6 eine Höhe von 77/91 Pixeln, aber eine Anbindung des gleichen Serums in exakt gleicher Konzentration, eine Höhe von 149 Pixeln. Dieses Ergebnis gab Raum für Interpretationen und wird unten in Kapitel 6.3.3 weiter diskutiert.

Als alternative Messmethode wurde eine RfS auf Mannanoberfläche durchgeführt. Abbildung 52 zeigt die aufgenommen Sensorgramme. Auch hier erfolgte die Messung auf zwei separaten Kanälen bei identischem Messablauf. Nach Blockierung der Mannanoberfläche konnte das Fusionsprotein erfolgreich auf die Oberfläche immobilisiert werden. Im Anschluss erfolgte die Applikation der Seren. Hier konnte ebenfalls eine positive Detektion des Vollbildserums erhalten werden, im Gegensatz bei Verwendung des anti-VlsE negativen Serums, bei dem keine Anbindung registriert wurde. Das Kontrollexperiment aus Abbildung 44 hatte auch hier seine Gültigkeit. Diese Messungen untermauerten die Ergebnisse der SPR.

6.3.3 Diskussion der biosensorischen Messungen für ConA-OspC und ConA-C6 im Zusammenhang

Es wurde beobachtet, dass die Fusionsproteine auf der Mannanoberfläche eine bessere Funktionalität aufwiesen, im Kontrast zu den C-18-Oberflächen. Dies äußerte sich in einer höheren Anbindungsrate von anti-OspC, bzw. anti-VlsE Antikörpern aus dem Blutserum, bei vergleichsweise geringerer Anbindung von Fusionsprotein an die Oberfläche, im Vergleich zur C-18-Oberfläche. Wie schon in der Einleitung in Kapitel 1.1 erwähnt wurde, kommt es bei der hydrophoben Immobilisierung von Antikörpern zu einem extrem hohen Verlust der Funktionalität. Die Antikörper könnten durch ihre Immobilisierung deformiert werden oder einfach richtungsverkehrt anbinden, was zu einem Funktionsverlust führt. Übertragen auf das Fusionsprotein könnte dies bedeuten, dass bei Immobilisierung auf C-18-Oberfläche ein ähnlicher Fall eintritt. Das Protein wird deformiert oder in verschiedenen Richtungen immobilisiert, was zu einer sterischen Hinderung oder einem Funktionsverlust führt. Dies würde die hohe Anbindungsrate von Fusionsprotein mit der vergleichsweise niedrigen Detektion von Antikörpern erklären. Im Gegensatz dazu kann

auf der Mannanoberfläche das Fusionsprotein zielgerichtet binden und, bei vergleichsweise niedriger Anbindungsrate, eine hohe Anzahl Antikörper detektieren. Dieser Effekt war von vorn herein ein Anliegen in diesem Forschungsvorhaben. Die zielgerichtete Anbindung von Antigenen oder Antikörpern für eine effektive Detektion, mit einer Verbesserung der Nachweisgrenze. Dieser Effekt konnte somit sehr gut demonstriert werden.

6.3.4 ELISA Messungen mit ConA-OspC und ConA-C6 in direktem Vergleich zur Ermittlung der Signifikanz

Zur Ermittlung der Spezifität und Signifikanz der Fusionsproteine, bei Anwendung weiterer Serumproben, wurde eine ELISA-Messreihe durchgeführt. Das Balkendiagramm hierzu ist in Abbildung 53 Kapitel 5.6 zu finden. Die Fusionsproteine ConA-C6 und ConA-OspC zeigten beide eine gute Spezifität und Signifikanz für die jeweiligen positiven Testseren. Die Signifikanz betrug laut p-Wert über 99%. Dieses Ergebnis ist sehr positiv, dennoch bemerkte man, anhand der Signalthöhen, einen Unterschied zwischen den Fusionsproteinen. Die Signalthöhen des ConA-C6 fielen, bei Verwendung der positiven Testseren, wesentlich höher aus, als bei ConA-OspC. Dies könnte mit der bereits erwähnten Problematik in der Stabilität zusammenhängen. Bei Inkubation des Fusionsproteins im ELISA wurde eine Zeit von einer Stunde eingehalten, um dem Protein genügend Zeit für die Adsorption zu geben. Allerdings begann nach 45 Minuten in manchen Wells das ConA-OspC Protein bereits auszufallen. Dies führte zu einer geringeren Konzentration an aktivem Protein und damit auch zu einer erniedrigten Signalstärke.

6.3.5 Langzeitstudien der Fusionsproteine ConA-OspC und ConA-C6

Das Problem der Stabilität bei Lagerung der Proteine sollte mittels Lyophilisierung behoben werden. Um die idealen Bedingungen für eine Lyophilisierung herauszufinden, wurden im Anschluss an die ELISA-Messungen (Kapitel 5.7), Messreihen über 180 Tage durchgeführt, wobei die Bedingungen der Lyophilisierung variierten. Die Proteine sollten zukünftig in ELISA-Platten oder in 3D-Polymersinterkörpern für mindestens ein halbes Jahr gelagert werden können. Aus diesem Grund wurden stabilisierende Reagenzien sowie verschiedene Lagerungsbedingungen, getestet.

ConA-OspC zeigte in dieser Lagerungsstudie sehr deutlich die Problematik seiner Instabilität. In den Versuchsreihen, in denen keine stabilisierenden Reagenzien eingesetzt wurden, war spätestens nach Ablauf von 50 Tagen nur wenig mehr als ein Grundrauschen detektierbar. Insbesondere stach hier der 4°C Wert heraus. Die Lagerung unter dem Gefrierpunkt brachte hier schon einen geringen Vorteil. Bei Addition der Saccharose waren erste Verbesserungen in der Lagerzeit zu bemerken. Die Proben bei 4°C unterschieden sich nun kaum mehr von den Proben bei -20°C und -80°C. Dennoch waren die meisten Platten bei Ablauf von 70 Tagen unbrauchbar. Erst die Addition des kommerziellen LPS ergab im Fall der hydrophoben Immobilisierung ein brauchbares Ergebnis, selbst nach 180 Tagen Lagerungszeit und im Fall der Mannanoberfläche ein sehr gutes Ergebnis. Hier waren noch gut 70% des Anfangssignals nach 180 Tagen vorhanden.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei Betrachtung der Ergebnisse für ConA-C6. Insgesamt zeigte sich das Protein aber stabiler. Die Lyophilisierung ohne Zusätze ergab auch hier wieder die schlechtesten Ergebnisse. Auf der Mannanoberfläche ging das Signal nach 50 Tagen im Grundrauschen unter. Die Anwendung von Saccharose zeigte auch hier bessere Ergebnisse. Die 4°C Proben glichen sich auch hier den Signalthöhen der -20°C und -80°C Proben an. Dennoch sank auf der Mannanoberfläche das Signal nach 50 Tagen wieder auf Niveau des Grundrauschens. Auch hier zeigte erst die Verwendung des kommerziellen LPS gute Ergebnisse. Zudem ist zu bemerken, dass gerade auf der Mannanoberfläche der LPS sein ganzes Potential entfalten konnte. Hier zeigten sich die besten Ergebnisse mit über 75% Signalerhalt nach 180 Tagen.

Auffällig ist, dass in beiden Fällen der LPS in Kombination mit der Mannanoberfläche die besten Ergebnisse gezeigt hat. Da es ein kommerzielles Produkt ist, ist die Zusammensetzung dieser Lösung Betriebsgeheimnis und wird nicht preisgegeben. Daher lässt sich nur vermuten, dass eine Art synergistischer Effekt auftritt. Vielleicht liegt der Schlüssel in der Kombination der einzelnen Bestandteile, sodass die Mannanoberfläche mit Fusionsprotein gut konserviert wird.

Die Messungen, die in Kapitel 5.7 dargestellt wurden, geben ein Szenario wieder, welches im schlimmsten Fall während der Lagerung passieren könnte. Unter den gegebenen Bedingungen war es leider nicht möglich, eine ausreichende Kontrolle der Luftfeuchte durchzuführen, wodurch die ELISA-Platten auch Schaden davon getragen haben können.

In einem industriellen Umfeld, bei professioneller Lagerung, wären eventuell positivere Ergebnisse zu erwarten, was für die Verwendung natürlich erfreulich wäre.

6.4 fTLI-Assay mit ConA-ProtA

Zur Immobilisierung unmarkierter IgG-Moleküle auf eine Zuckeroberfläche wurde das Linkerprotein ConA-ProtA entwickelt. In diesem Fall wurde ebenfalls zuerst eine genaue Literaturrecherche durchgeführt, um eine Möglichkeit zu finden, das ProtA nicht in Volllänge an die ConA-Domäne zu fusionieren. Wie im Fall des ConA-C6 schon gezeigt wurde, konnte durch die Verkleinerung des Proteins eine Verbesserung während der Rückfaltung und in der Stabilität hervorgerufen werden. Aus diesem Grund wurde die Konsensus Sequenz der Domänen A-D verwendet. Das Linkerprotein konnte daraufhin erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden. Abbildung 69 zeigt eine SDS-PAGE der aufgereinigten Proteinfraction mit einer Reinheit von über 95%.

6.4.1 Bindungsstudien

Zur Etablierung einer Messmethode wurde ein Modell-Assay mittels RIfS durchgeführt. Für diesen Modell-Assay wurde das gleiche Schema verwandt wie in den Experimenten mit ConA-SAV, da sich dieses System als erfolgreich dargestellt hatte. Der Modell-Assay wurde zuerst mittels RIfS auf einer C-18-Oberfläche (Abb. 71) und anschließend auf einer Mannanoberfläche getestet (Abb. 72). Die Messungen wurden, jeweils auf separaten Kanälen, mit dem gleichen Messablauf, durchgeführt. In beiden Fällen war die Anbindung des Linkerproteins auf die Oberfläche erfolgreich. Die Anbindung des Antikörpers an die ConA-Domäne verlief ebenfalls zufriedenstellend. Daraufhin wurde der Analyt appliziert. Bei Applikation des spezifischen Analyten wurde eine Anbindung registriert und im Fall des unspezifischen Analyten kam keine Anbindung zustande. Dieser Modell-Assay bewies die volle Funktionsfähigkeit des Linkerproteins auf C-18- sowie auf Mannanoberflächen. Im Anschluss wurde der Modell-Assay erfolgreich auf die SPR übertragen (Abb. 73). Nach dieser Vorarbeit, konnte nun das Linkerprotein mit den Komponenten getestet werden, welche für den fTLI Test notwendig waren.

Die Anwendung der fTLI-Komponenten stellte sich sehr schnell als ein Problem heraus. Das aufgereinigte fTLI-Antigen für Testzwecke war nur in einem Puffer mit minimal

25% Glycerol stabil. Für die SPR-Messungen erwies sich dies als unbrauchbares Medium. Das Signal schnellte in sekundenbruchteilen in die Höhe und stabilisierte sich erst nach etwaigen Waschschritten wieder. Allerdings konnte selbst danach keine explizite Anbindung des fTLI-Antigens an den Fängerantikörper detektiert werden. Aus diesem Grund war die Verwendung eines zweiten Detektionsantikörpers unabdingbar. Durch die Interpretation der Anbindungskurve konnte eine Anbindung des fTLI an den Fängerantikörper im Nachhinein festgestellt werden (Abb. 74, Kapitel 5.8.6).

Nachdem die Übertragung des Modell-Assays auf die Komponenten des fTLI-spezifischen Nachweisverfahrens angepasst worden waren, wurde eine Kalibriergerade mittels Realproben mit verschiedenen bekannten fTLI Konzentrationen erstellt. Die Erstellung der Kalibriergerade war erfolgreich. Allerdings mussten die Ergebnisse der Signalhöhen nach Anbindung des Serums, auf die Signalthöhe nach Anbindung des Fängerantikörpers, normiert werden. Dies geschah aus folgendem Grund: Die Anbindung des Fängerantikörpers variierte von Messkanal zu Messkanal. Zudem waren die Signale nach Anbindung des Serums in einem sehr engen Bereich verteilt, was eine eindeutige Kalibriergerade unmöglich machte. Wie in Tabelle 36 einzusehen, variierten die gemessenen Signalstärken nach Applikation des Serums um nur 10 Pixel. Dabei war die gemessene Spannbreite der fTLI Konzentration von 7,7 bis 120 ng/ml. Ohne Einbeziehung der Signalstärke des Fängerantikörpers war die Auflösung der Messmethode zu gering, um eine Kalibriergerade zu erstellen. Nach Normierung hingegen zeigte sich eine gute Linearität der Messwerte, welche zur eindeutigen Konzentrationsbestimmung notwendig ist.

6.4.2 Immunologische Detektion von fTLI auf 3D-Polymersinterkörpern

Zur Darstellung einer *Point-of-Care* Diagnostik wurde der fTLI-Assay auf die dreidimensionale Struktur der Polymersinterkörper übertragen. Hierzu wurde eine *Proof-of-Principle* Messung durchgeführt. Als Analyt diente hier das aufgereinigte fTLI-Antigen. Wie in Abbildung 75 zu sehen ist, konnte dieser Test erfolgreich auf den 3D-Polymersinterkörpern durchgeführt werden. Die Messungen waren bei hydrophober Immobilisierung des ConA-ProtA sowie bei Immobilisierung auf Mannanoberfläche erfolgreich. Nun konnte im nächsten Schritt die Erstellung einer Kalibriergerade erfolgen.

Diese Kalibriergerade wurde ebenfalls mit den Serumproben bekannter fTLI Konzentration durchgeführt und nicht mit dem aufgereinigten fTLI-Antigen, da sich eventuelle Mat-

rixeffekte nur so mit einberechnen lassen konnten. Die Messungen wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt und die Mittelwerte wurden zur Ermittlung der Kalibriergerade verwendet (Abb. 77/ Tab. 37). Um die Kalibriergerade zu testen, wurden weitere Serum Proben mit bekannter Konzentration gemessen (Abb. 78/Tab. 38). Die Werte wurden anschließend in einer Tabelle zusammengefasst. In der Tabelle sind die ermittelten Werte und die tatsächlichen Werte gegeneinander aufgelistet, um den Unterschied zu verdeutlichen. Die Messwerte ergaben, bis auf eine Ausnahme, eine maximale Abweichung von 6,5%. Zu den vorgegebenen Werten der fTLI Konzentration ist zu sagen, dass die Werte von der Firma Laboklin durch Western blot ermittelt wurden. Diese beiden Verfahren sind nicht gut miteinander vergleichbar, da es sich im Fall des Western blots um eine zweidimensionale Oberfläche und im Fall der Polymersinterkörper um eine dreidimensionale Oberfläche handelt. Daher kann nicht genau gesagt werden, welche Messungen genauer sind. Allerdings ist zu bemerken, dass trotz des Unterschieds der beiden Verfahren, die Messwerte in beiden Fällen eine Diagnostik auf eine Pankreas-Insuffizienz sowie auf eine akute Pankreatitis zulassen. Zudem ist herauszustellen, dass der Messablauf auf den Polymersinterkörpern mit einer Stunde wesentlich schneller ist, als im Western blot, welcher bis zu einem Tag dauern kann. Aus diesem Grund konnte auch dieser Teil der Arbeit als Erfolg gewertet werden. In weiteren Forschungsvorhaben könnten Verbesserungen im Bereich des Messablauf auf den Polymersinterkörpern erarbeitet werden, z.B. die Optimierung der Puffer sowie der Inkubationszeiten und Waschschrte. Zudem können Verbesserungen im Bereich der Oberflächenchemie eine homogenere Belegung der Oberfläche mit Linkerprotein ermöglichen, um eine gleichmäßigere Färbung der Polymerstruktur zu erreichen.

6.5 Rasterkraftmikroskopie

In den Abbildungsteilen a und b der Abbildung 79 erkennt man, nach Funktionalisierung mit Dextran, eine glattere Oberflächenstruktur, im Gegensatz zur unfunktionalisierten Glasoberfläche. Die Zuckerketten scheinen sich während des Funktionalisierungsvorgangs in die Zwischenräume der Oberfläche zu setzen und die Struktur zu glätten.

Wie in Kapitel 6.3.3 bereits angesprochen, wiesen alle Proteine auf den C-18-Oberflächen wesentlich höhere Anbindungsraten hervor, als auf den mit Zucker funktionalisierten Oberflächen. In den AFM Aufnahmen sind nach Beladung der Dextranoberfläche mit

Linkerprotein ConA-SAv einzelne sphärische Punkte zu erkennen, die als punktuelle Belegung mit Linkerprotein gedeutet werden können. Durch diese punktuelle Anheftung der Proteine auf der Zuckeroberfläche ergibt sich im Rückschluss die erniedrigte Anbindungsrate im Signal. Allerdings wurde auch in Kapitel 5.9 bereits erwähnt, dass eine punktuelle Belegung der Oberfläche mit Protein zu favorisieren ist, da sich somit weniger sterische Hinderungen für die Anbindung der nachfolgenden Proteine ergeben. Zudem könnte bei einer kompakteren Belegung die Oberfläche dazu neigen, kristalline Strukturen zu bilden, welche sich auf die Bindungseigenschaften der einzelnen Komponenten, im schlimmsten Fall, negativ auswirken könnten. Zudem ist im Hinblick auf die Regenerationsfähigkeit der Oberfläche eine eher inhomogene Oberflächenstruktur förderlich, da somit der Regenerationslösung eine bessere Angriffsfläche geboten wird. Dies steht im Gegensatz zu einer kristallinen und damit kompakten Oberfläche, wo die Regenerationslösung nicht an die ConA-Domäne vordringen könnte, um eine Ablösung hervorzurufen.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Linker-/Fusionsproteine rekombinant hergestellt und getestet. Diese dienten der Entwicklung neuartiger Analyseverfahren sowie der Verbesserung bereits bestehender antikörperbasierter Analyseverfahren. Hierbei wurde vor allem die Eigenschaft des Concanavalin A Proteins genutzt, um die Proteine auf Oberflächen zu immobilisieren, die vorher mit einer Zuckerverbindung beschichtet wurden. Die zweite Domäne der Proteine wurde je nach Verwendung angepasst.

Das universale, bifunktionale Linkerprotein ConA-SAv sollte der Entwicklung eines Anreicherungsmoduls, für die Aufreinigung eines Analyten aus komplexen Matrices dienen. Hierzu wurde das Gen der Concanavalin A Bindedomäne C-terminal, mittels Alanin Linker, an das Gen der Streptavidin Bindedomäne fusioniert, um die Anbindung biotinylierter Antikörper zu ermöglichen. Die Expression wurde in *E. coli* durchgeführt und die Funktionalität des Proteins mit verschiedenen Methoden untersucht. Das Ergebnis der Co-Immunopräzipitation bewies die volle Funktionsfähigkeit des Linkerproteins ConA-SAv; beide funktionalen Domänen sind bindungsaktiv. Die Regenerierbarkeit von der Dextran-Matrix in Form von Sephadex® G-25 Beads konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der RIfS-Messungen sind ebenfalls positiv zu werten. Das Linkerprotein allein konnte problemlos von einer mit Dextran funktionalisierten Chipoberfläche, durch einen konkurrierenden Zucker abgelöst werden. Allerdings war die Regeneration des Linkerproteins, bei Anbindung des biotinylierten Antikörpers, eingeschränkt. Zur weiteren Untersuchung wurden SPR-Messungen durchgeführt. Diese bestätigten die Beobachtungen, die bereits an der RIfS gemacht wurden. Das Linkerprotein war bei Anbindung eines biotinylierten Antikörpers nicht mehr von der Oberfläche zu lösen. Ein Lösungsansatz war die Generierung verschiedener Mutanten. Hierzu wurde auf genetischem Weg die Bindetasche des ConA modifiziert. Die Mutanten D90N und R110K wurden ebenfalls getestet, wobei sich herausstellte, dass die Bindungsaktivität entweder fraglich oder nicht mehr vorhanden war.

Im weiteren Verlauf wurden Fusionsproteine für die Borreliosediagnostics entwickelt. Hierzu wurden spezielle Oberflächen-Antigene ausgewählt, gegen welche das Immunsystem, insbesondere in der Frühphase der Infektion, während der IgM Antwort, Antikörper bildet. Nach Literaturrecherche stellten sich das Oberflächen Protein C (OspC) sowie ein Epitop (C6) des VlsE Antigens als gute Wahl heraus. Beide cDNA Sequenzen der Epito-

pe wurden jeweils C-terminal, durch eine kurze Linkersequenz, an die cDNA Sequenz des ConA gekoppelt und anschließend in *E. coli* rekombinant hergestellt. Nach Expression wurden die Fusionsproteine mittels SPR und RfS auf ihre Funktionalität untersucht. Die Ergebnisse der SPR-Messungen zeigten die Funktionalität beider Fusionsproteine. Die Fusionsproteine banden auf die mit Mannan funktionalisierten Goldoberflächen und detektierten spezifisch die Antikörper aus den Testseren. Die Messungen mittels RfS konnten diese Beobachtungen nur bestätigen. Allerdings erwies sich insbesondere das ConA-OspC Protein als wenig stabil. Daher wurde, in Hinblick auf einen Einsatz in kommerziell erhältlichen Produkten, die Lagerbeständigkeit bei Lyophilisierung der beiden Proteine untersucht. Diese Untersuchungen wurden mittels ELISA-Messreihen durchgeführt. In den ELISA-Messungen zeigten beide Proteine eine sehr hohe Signifikanz in der Detektion der Borreliose-Antikörper aus dem Blutserum. Sie behielten auch nach der Lyophilisierung ihre Funktionsfähigkeit, allerdings bestätigten sich auch hier wieder die Ergebnisse aus den SPR-Messungen. ConA-OspC war im Gegensatz zu ConA-C6 wesentlich instabiler und verlor stark an Signalstärke. Jedoch konnte durch die Anwendung spezieller stabilisierender Reagenzien die Signalstärke und die Lagerbeständigkeit verbessert werden.

Zuletzt wurde ein zweites, universelles Linkerprotein entwickelt, welches es ermöglichte, eine Vielzahl unmarkierter IgG-Antikörper auf mit Zucker funktionalisierten Oberflächen zu binden. Hierzu wurde die cDNA einer Bindedomäne des Protein A C-terminal, durch eine kurze Linkersequenz, an die cDNA Sequenz des ConA gekoppelt und anschließend in *E. coli* rekombinant hergestellt. Die Funktionstestung erfolgte mittels SPR, zuerst unter Anwendung eines Modell-Assays, der anschließend erfolgreich auf eine Diagnostik im Veterinärbereich übertragen wurde. Die Detektion einer akuten Pankreatitis sowie einer Pankreas-Insuffizienz bei Katzen, erfolgte über die Messung des fTLI Spiegels im Blutserum. Mittels SPR gelang die Erstellung einer Kalibriergeraden aus Proben mit bekannter fTLI Konzentration, zur weiteren Ermittlung von unbekannten fTLI Konzentrationen in Realproben. Um eine *Point-of-Care* Diagnostik darzustellen, wurden 3D-Polymersinterkörper mit einer Zuckerverbindung funktionalisiert und die Analysenmethode wurde von der 2D- auf die 3D-Oberfläche übertragen. Auch hier gelang die Erstellung einer Kalibriergeraden anhand bekannter Probenkonzentration. Auf dieser Grundlage konnte erfolgreich eine weiterführende Konzentrationsbestimmung, in Realproben mit unbekannter fTLI Konzentration, durchgeführt werden.

8 Fazit

Im vorliegenden Forschungsvorhaben konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Fusions- bzw. Linkerproteinen mehrere Vorteile hat. Zum einen konnten die jeweiligen Eigenschaften der Proteine erhalten werden, ohne dass sich eine gegenseitige negative Wechselwirkung gezeigt hat. Zum anderen konnte gerade durch diese Proteine eine gezielte Immobilisierung von Antikörpern und Antigenen auf einer Zuckeroberfläche erfolgen, welche die Effektivität der immunologischen Interaktion erheblich gesteigert hat. Hierbei konnte bei einer vergleichsweise geringen Anbindung von Fusionsprotein eine erheblich größere Anzahl von Analytmolekülen gebunden werden, als in Vergleichsmessungen auf C-18-Oberfläche. Dieses Phänomen wurde in Kapitel 6.3.3 bereits näher erläutert. Somit stellt sich auch der Mehrwert der Mannanoberfläche dar. Durch sie kann eine gerichtete Immobilisierung der Fusions-/ Linkerproteine erfolgen, gleichzeitig aber auch eine Reduktion von unerwünschten, hydrophoben Wechselwirkungen von Analytmolekülen auf die Sensorchipoberflächen bewirken. Diese Beobachtungen konnten auch in weiterführenden Projekten, die nicht Teil dieses Forschungsvorhabens waren, in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden.

Zudem stellte sich die Verwendung von einzelnen Protein-Epitopen und Bindedomänen, anstelle von Vollängenproteinen, als wegweisend heraus. Durch die Verwendung der wesentlich kleineren Epitope und der daraus resultierenden Verringerung der Gesamtgröße, konnte eine wesentlich höhere Stabilität der Fusions-/Linkerproteine hervorgerufen werden. Dies wurde deutlich im Vergleich der Fusionsproteine ConA-OspC und ConA-C6 (siehe Kapitel 6.3.5). Im Fall des Linkerproteins ConA-ProtA konnte durch die Verwendung von nur einer Bindedomäne wahrscheinlich eine Interaktion zwischen mehreren Linkerproteinen vermieden werden. Diese Vermutung wird gestützt durch die gute Stabilität des Linkerproteins, auch über längere Zeit, ohne bemerkbare Denaturierung und die sehr gute Anbindungsrate von Antikörpern auf die Oberfläche.

Verbesserungsbedarf zeigt sich bei den Bindungseigenschaften der ConA-Domäne, gerade im Hinblick auf die Regenerationsfähigkeit der Oberflächen. Hier sollten in Zukunft gezielt durch Protein Strukturanalyse und gezielte Rechenmodelle eine Auswahl an Mutationen erzeugt werden, um die Bindungseigenschaften für eine Regeneration der Oberfläche positiv zu beeinflussen.

Zudem hat sich gerade durch die Expression der Fusions-/ Linkerproteine in Inclusion bodies, das Problem der Rückfaltung sowie deren Haltbarkeit ergeben. Auch hier kann in Zukunft durch weitere Versuchsreihen eine Optimierung der Expression sowie der Lagerungsbedingungen erzielt werden, um die Proteine für die industrielle Anwendung zu verbessern.

9 Literaturverzeichnis

- Agrawal BBL, Goldstein IJ.** Concanavalin A, the jack bean (*Canavalia ensiformis*) phytohemagglutinin. *Meth Enzymol* **28**, 313-318 (1972)
- Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP.** Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology* **18** (3), 484-509 (2005).
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Molekularbiologie der Zelle. Herausgeber Ulrich Schäfer; 5. Aufl., Kapitel 12 Seite 790-792 (2011)
- Amet N, Lee HF, Shen WC.** Insertion of the designed helical linker led to increased expression of tf-based fusion proteins. *Pharm Res.* **26**, 523–528 (2009)
- Argos P.** An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *J Mol Biol.* **211**, 943–958 (1990)
- Axén R, Porath J.** Chemical coupling of enzymes to cross-linked dextran ('Sephadex'). *Nature* **210**(5034), 367-369 (1966)
- Baenziger JU, Fiete D.** Structural Determinants of Concanavalin A Specificity for Oligosaccharides. *The Journal of Biological Chemistry* **254** (7), 2400-2407 (1979)
- Baneyx F, Mujacic M.** Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology.* **11** (22), 1399-1408 (2004)
- Becker JW et al.** The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. *The Journal of Biological Chemistry* **250** (4), 1513-1524 (1979)
- Betton GR, Owen LN.** Allogeneic grafts of spontaneous canine melomas and their cell culture strains in neonatal immunosuppressed dogs. *Br J. Cancer* **34**, 374-380 (1976).

- Binnig G, Quate CF, Gerber Ch.** Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*. **56** (9), 930-933 (1986)
- Bonifacino JS, Dell'Angelica EC und Springer TA.** Immunoprecipitation. *Current Protocols in Molecular Biology* Kapitel 10.16.1-10.16.29 (2001)
- Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, McMahon MJ:** Chronic pancreatitis. *Lancet*. **377** (9772), 1184–1197 (2011)
- Brorson O, Brorson SH.** Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. *Infection*. **4** (25), 240-246 (1997)
- Brown RD, Koenig SH & Brewer CF.** Conformational equilibrium of demetalized Concanavalin A. *Biochemistry* **21**, 465–9 (1982).
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, GrunwaldtE, Davis JP.** Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science (New York, N.Y.)*. **4552** (216), 1317-1319 (1982)
- Chandra A, Latov N, Wormser GP, Marques AR, Alaedini A.** Epitope Mapping of Antibodies to VlsE Protein of *Borrelia burgdorferi* in Post-Lyme Disease Syndrome *Clinical Immunology* **141** (1), 103-110 (2011).
- Chen X, Zaro JL, Shen WC.** Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. *Adv Drug Deliv Rev*. **65** (10), 1357–1369 (2013)
- Chen X, Zaro JL, Shen WC.** Pharmacokinetics of recombinant bifunctional fusion proteins. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. **8**, 581–595 (2012)
- Chivers CE, Koner AL, Lowe ED, Howarth M.** How the biotin–streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochem J*. **435**, 55-63 (2011).

- Chodosh LA, Buratowski S.** Purification of DNA-Binding Proteins Using Biotin/Streptavidin Affinity Systems. *Curr Protoc Protein Sci.* Chapter 9: Unit 9.7. (2001).
- Chong S, Montello GE, Zhang A, Cantor EJ, Liao W, Xu MQ, Benner J.** Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucleic Acids Res.* **26** (22), 5109-5115 (1998)
- Chrispeels MJ, Hartl PM, Arndt S & Faye L.** Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of Concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 10021–10024 (1986).
- DeChancie J, Houk KN.** The origins of femtomolar protein-ligand binding: hydrogen-bond cooperativity and desolvation energetics in the biotin-(strept) avidin binding site. *J Am Chem Soc.* **129** (17), 5419-5429 (2007).
- Derewenda Z et al.** The structure of the saccharide-binding site of *Concanavalin A*. *The EMBO Journal* **8** (8), 2189-2193 (1989)
- Dickson C.** Protein techniques: immunoprecipitation, in vivo kinase assays, and Western blotting. *Methods Mol Biol.* **461**, 735 (2008)
- Dincturk HB, Dunn AJ und Jones DH.** Recombinant pre-pro-Concanavalin A (jack bean) is stable but of low solubility. *J. Biosci.* **26** (5), 635-640 (2001)
- Engvall E, Perlman P.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* **8** (9), 871-874 (1971)
- Frossard JL, Steer LM, Pastor CM.** Acute pancreatitis. *Lancet.* **371** (9607), 143–152 (2008)
- Gaughlitz G.** Direct optical sensors: Principles and selected applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **381**, 141–55 (2005).

- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA und Kuby J.** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Immunology* **5**, 148-150 (2003)
- Goldstein IJ, Poretz RD.** The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine. Orlando, USA: Academic Press Inc. 600 p. (1986).
- González M. et al.** Interaction of Biotin with Streptavidin: Thermostability and conformational changes upon binding. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 11288–11294 (1997).
- Hanahan, D.** Studies on transformation *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol. Biol.* **166**, 557-580 (1983).
- Hartmann, M; Nikitin, P; Keusgen, M.** Innovative analytical system for screening on lectins *Biosensors & Bioelectronics* **22** (1), 28-34 (2006).
- Haworth WN et al.** Polysaccharides. Yeast mannan. *J. Chem. Soc.* **24**, 784-91, (1937)
- Helling, R.B., Goodman, H.M. & Boyer, H.W.** Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.* **14**, 1235-1244 (1974).
- Hendrickson W et al.** Crystal structure of core Streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 2190–4 (1989).
- Holmberg A et al.** The Biotin-Streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* **26**, 501–10 (2005).
- Huber W, Schmid RM.** Akute Pankreatitis: Evidenzbasierte Diagnostik und Therapie. *Dtsch Arztebl Jg. 104*, **25** (22), 1832-1841 (2007)

- Hudson CR, Frye JG, Quinn FD, Gherardini FC.** Increased expression of *Borrelia burgdorferi* vlsE in response to human endothelial cell membranes. *Mol Microbiol.* **41** (1), 229-239 (2001)
- Jonkheijm P, Weinrich D, Schröder H, Niemeyer CM, Waldmann H.** Chemical strategies for generating protein biochips. *Angew Chem Int Ed Engl.* **47** (50), 9618-9647 (2008)
- Joung J, Ramm E, Pabo C.** A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97** **13**, 7382–7387 (2000)
- Junker, Schlebusch H, Lupp PB.** Patientennahe Labordiagnostik in Klinik und Praxis. *Dtsch Arztebl Int.* **107** (33), 561 (2010)
- Kaboord B, Perr M.** Isolation of Proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol.* **424**, 349-364 (2008)
- Kalb J & Levitzki A.** Metal-Binding Sites of Concanavalin A and their role in the Binding of α - Methyl D-Glucopyranoside. *Biochem. J.* **109**, 669-672 (1968).
- Kennedy JF, Palva PMG, Corella MTS, Cavalcanti MSM & Coelho LCBB.** Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers* **26**, 219–230 (1995)
- Keusgen M, Glodek J, Milka P, Krest I.** Immobilisation of Enzymes on PTFE Surfaces. *Biotechnol. Bioeng.* **72**, 530-540 (2000).
- Keusgen M.** Biosensors: New approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften* **89**, 433–444 (2002).
- King J and Betts S.** A green light for protein folding. *Nature Biotechnology* **17**, 637 - 638 (1999)

Krauss H, Weber A, Enders B (Hrsg.): *Zoonosen. Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. Kapitel: Borreliosen* Köln: Deutscher Ärzteverlag, 3. Auflage 2004; ISBN 978-3769104066

Kulinsky L, Noroozi Z, Madou M. Present technology and future trends in point-of-care microfluidic diagnostics. *Methods in molecular biology* **949**, 3-23 (2013)

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).

Lawrenz MB, Hardham JM, Owens RT, Nowakowski J, Steere AC, Wormser GP & Norris SJ. Human Antibody Responses to VlsE Antigenic Variation Protein of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol.* **37** (12), 3997–4004 (1999)

Lequin R. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* **51** (12), 2415-2418 (2005)

Liang FT, Alvarez AL, Gu Y, Nowling JM, Ramamoorthy R, Philipp MT. An Immunodominant Conserved Region Within the Variable Domain of VlsE, the Variable Surface Antigen of *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol.* **163**, 5566-5573 (1999).

Liang FT, Jacobson RH, Straubinger RK, Grooters A, Philipp MT. Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE Invariable Region Useful in Canine Lyme Disease Serodiagnosis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin Microbiol.* **38** (11), 4160-4166 (2000).

Licastro F, Barbieri L, Krajhanzi A, Kocourek J & Stripe F. A cortical lectin from the oocytes of *rutilus rutilus* stimulates mitogenic activity and release of soluble factors from human lymphocyte cultures and inhibits protein synthesis in a cell-free system. *International Journal of Biochemistry* **23**, 101–105 (1991).

Lueking A, Cahill DJ, Müllner S. A new and versatile platform technology for molecular medicine. *Drug Discov Today.* **10** (11), 789-794 (2005)

Luppa PB, Schlebusch H. POCT - Patientennahe Labordiagnostik. Springer, Berlin 2008, ISBN 978-3540791515

Maeda Y, Ueda H, Kazami J, Kawano G, Suzuki E, Nagamune T. Engineering of functional chimeric protein G-Vargula luciferase. *Anal Biochem.* **249**, 147–152 (1997)

Mandal DK, Brewer FC. Differences in the binding affinities of dimeric Concanavalin A (including acetyl and succinyl derivatives) and tetrameric Concanavalin A with large oligomannose-type glycopeptides. *Biochemistry* **32**, 5116-5120 (1993).

Mandel, M. & Higa, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162 (1970).

Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. Molecular cloning: A Laboratory Manual. New York: *Z Allg Mikrobiol* **24**, 32 (1982).

Master SC. Co-immunoprecipitation from transfected cells. *Methods Mol Biol.* **261**, 337-350 (2004)

Mayerle J, Hoffmeister A, Witt H, Lerch MM, Mössner J. Chronische Pankreatitis: Definition, Ätiologie, Diagnostik und Therapie. *Dtsch Arztebl Int.* **110** (22), 387–393 (2013)

McCubbin WD & Kay CM. Molecular weight studies on Concanavalin A. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* **44**, 101–109 (1971).

Milka P, Krest I, Keusgen M. Immobilization of alliinase on porous aluminium oxide. *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 344-348 (2000).

Min W, Dunn AJ, Jones DH. Non-glycosylated recombinant pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage. *EMBO J.* **11** (4), 1303-1307 (1992).

Moks T, Abrahmsen L, Nilsson B, Hellman U, Sjöquist J und Uhlen M. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur. J. Biochem.* **156**, 637-643 (1986)

Montanier C, Flint JE, Bolam DN, Xie H, Liu Z, Rogowski A, Weiner DP, Ratnaparkhe S, Nurizzo D, Roberts SM, Turkenburg JP, Davies GJ, Gilbert HJ. Circular Permutation Provides an Evolutionary Link between Two Families of Calcium-dependent Carbohydrate Binding Modules. *J Biol Chem.* **285** (41), 31742-31754 (2010).

Moreira LR, Filho EX. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems *Appl Microbiol Biotechnol.* **79** (2), 165-78 (2008)

Motaleb MA, Corum L, Bono JL et al. *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **20** (27), 10899-904 (2000)

Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E. Humangenetik. 7. kompl. überarb. Auflage Georg Thieme Verlag (2006) ISBN 978-3-13-139297-8

Nakajima T, Yazawa S, Kogure T & Furukawa K. Purification and characterization of N-acetyl-D-galactosamine-binding lectin from *Falcata japonica*. *Biochimica et Biophysica Acta* **964**, 207–212 (1988).

Norris SJ. Antigenic variation with a twist – the *Borrelia* story. *Molecular Microbiology* (2006).

Ong PK et al. Effect of erythrocyte aggregation and flow rate on cell-free layer formation in arterioles. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, **298**(6), 1870-1878 (2010)

- Pal U, Yang X, Chen M, Bockenstedt LK, Anderson JF, Flavell RA, Norgard MV, Fikrig E.** OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J Clin Invest.* **113** (2), 220-230 (2004)
- Popov, N. u. a.** Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates. *Acta Biol. Med. Ger.* **34**, 1441-1446 (1975).
- Porath J, Axén R.** Immobilization of enzymes to agar, agarose, and Sephadex supports. *Methods Enzymol.* **44**, 19-45 (1976)
- Proll G, Markovic G, Steinle L, and Gauglitz G.** Reflectometric interference spectroscopy. *Biosens. Biodetect.* **503**, 167-178 (2009).
- Quioco F.** Carbohydrate-Binding Proteins: Tertiary structures and protein-sugar interactions. *Annual Review of Biochemistry* **55**, 287–315 (1986).
- Rauter C, Hartung T.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Applied and environmental microbiology.* **11** (71), 7203-16 (2005)
- Renart, J., Reiser, J. & Stark, G.R.** Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **76**, 3116-3120 (1979).
- Reznik GO, Vajda SLSC, Cantor CR & Takeshi S.** Streptavidins with intersubunit crosslinks have enhanced stability. *Nature Biotechnology* **14**, 1007–1011 (1996)
- Roche RJ & Moxon ER.** Phenotypic variation of carbohydrate surface antigens and the pathogenesis infections of *Haemophilus influenzae* infections. *Trends in Microbiology* **3**, 304–309 (1995)

- Saha K, Bender F & Gizeli E.** Comparative study of IgG binding to proteins G and A: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device. *Analytical Chemistry* **75**, 835–42 (2003).
- Schaffner W und Weissmann C.** A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* **56**, 502–514 (1973).
- Schmidt SR.** Fusion-proteins as biopharmaceuticals--applications and challenges. *Curr Opin Drug Discov Devel.* **12**, 284–295 (2009)
- Shimomura O.** The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy* **217**, 1-15 (2005)
- Shuttleworth HL, Duggleby CJ, Jones SA, Atkinson T & Minton NP.** Nucleotide sequence analysis of the gene for protein A from *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (NCTC8530) and its enhanced expression in *Escherichia coli*. *Gene* **58** (2-3), 283-95 (1987)
- Sjödahl J.** Structural studies on the four repetitive Fc-binding regions in protein A from *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem.* **78** (2), 471-90 (Sept. 1977)
- Steiner JM, Williams DA.** Serum feline trypsin-like immunoreactivity in cats with exocrine pancreatic insufficiency. *J Vet Intern Med.* **14** (6), 627-9 (2000)
- Steiner JM.** Exocrine pancreatic insufficiency in the cat. *Top companion Anim Med* **27** (3), 113-6 (2012)
- Stürenburg E, Junker R.** Point-of-care testing in microbiology: the advantages and disadvantages of immunochromatographic test strips. *Dtsch Arztebl Int.* **106** (4), 48-54 (2009)
- Tilly K, Rosa PA, Stewart PE.** Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infectious disease clinics of North America.* **2** (22), 217-34 (2008)

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* **24**, 145-9 (1992).
- Towbin H., Staehelin T. & Grodon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **76**, 4350-4354 (1979).
- van Dongen WD & Heck AJR.** Binding of selected carbohydrates to apo-Concanavalin A studied by electrospray ionization mass spectrometry. *The Analyst* **125**, 583–589 (2000)
- Van Tomme SR, Hennik WE.** Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications. *Expert Review of Medical Devices* **4**(2), 147-164 (2007)
- Ventura S, Villaverde A.** Protein quality in bacterial Inclusion Bodies. *Trends in biotechnology* **4** (24), 179-18 (2006)
- Weber K, Osborn M.** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem.* **244** (16), 4406-12 (1969).
- Weber PC, Ohlendorf DH, Wendoloski JJ, Salemme FR.** Structural origins of high-affinity biotin binding to Streptavidin. *Science* **6 243** (4887), 85-88 (1989).
- Wilcheck M. & Bayer EA.** Introduction to Avidin-Biotin technology. *Methods in Enzymology* **184**, 5–13 (1990)
- Yamauchi D, Minamikawa T.** Structure of the gene encoding concanavalin A from *Canavalia gladiata* and its expression in *Escherichia coli* cells. *FEBS Letters* **260** (1), 127-130 (1989)

Yan Q, Zhu L, Kumar N, Jiang Z & Huang L. Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity. *Food Chemistry* **122**, 589–595 (2010).

Yetsin AK, Akram S, Lowe CR. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*. **13** (12), 2210-2251 (2013)

10 Anhang

10.1 DNA-Sequenz von ConA-SAv

1–50	ATGGCATCAA	CACATGAGAC	AAATGCACTC	CATTTTCATGT	TCAACCAATT
51–100	TAGCAAAGAT	CAGAAGGATT	TGATCCTTCA	AGGTGACGCC	ACAACAGGAA
101–150	CAGATGGTAA	CTTGGAAGTC	ACAAGGGTGT	CAAGTAATGG	GAGTCCACAG
151–200	GGAAGCAGTG	TGGGCCGGGC	TTTGTCTAT	GCCCCAGTCC	ACATTTGGGA
201–250	AAGTTCTGCT	GTGGTGGCAA	GCTTTGATGC	TACCTTTACA	TTTCTCATAA
251–300	AATCACCCGA	CTCTCACCCA	GCTGATGGAA	TTGCCTTCTT	CATTTCAAAT
301–350	ATTGACAGTT	CCATCCCTAG	TGGTTCCACT	GGAAGGCTCC	TTGGACTCTT
351–400	CCCTGATGCA	AATGTTATCA	GAAATTCCAC	TACTATTGAT	TTCAACGCTG
401–450	CTTACAATGC	CGATACTATT	GTTGCTGTTG	AATTGGATAC	CTATCCCAAT
451–500	ACTGATATTG	GAGATCCAAA	TTATCCACAC	ATCGGTATCG	ATATTAAATC
501–550	TGTTGCTCC	AAGAAGACCG	CAAAGTGGAA	CATGCAAAAT	GGAAAGGTAG
551–600	GCACTGCACA	CATCATCTAT	AACTCTGTTG	GTAAGAGACT	AAGTGCTGTT
601–650	GTTTCTTATC	CTAACGGTGA	CTCTGCCACT	GTCTCTTACG	ACGTTGACCT
651–700	CGACAATGTC	CTTCCTGAAT	GGGTTAGAGT	TGGCCTTTCT	GCTTCAACCG
701–750	GACTTTACAA	AGAAACCAAT	ACCATTCTCT	CATGGTCTTT	TACTTCTAAG
751–800	TTGAAGAGCA	ATGAGATCCC	GGACATTGCT	ACCGTGGTTG	GATCAGGTGC
801–850	TGCTGAAGCA	GGTATCACCG	GCACCTGGTA	CAACCAGCTC	GGCTCGACCT
851–900	TCATCGTGAC	CGCGGGCGCC	GACGGCGCCC	TGACCGGAAC	CTACGAGTCG
901–950	GCCGTGCGCA	ACGCCGAGAG	CCGCTACGTC	CTGACCGGTC	GTTACGACAG
951–1000	CGCCCCGGCC	ACCGACGGCA	GCGGCACCGC	CCTCGGTTGG	ACGGTGGCCT
1001–1050	GGAAGAATAA	CTACCGCAAC	GCCCACTCCG	CGACCACGTG	GAGCGGCCAG

1051–1100	TACGTCGGCG	GCGCCGAGGC	GAGGATCAAC	ACCCAGTGGC	TGCTGACCTC
1101–1150	CGGCACAACC	GAGGCCAACG	CCTGGAAGTC	CACGCTGGTC	GGCCACGACA
1151–1200	CCTTCACCAA	GGTGAAGCCG	TCCGCCGCCT	CCGGATCCGA	ACAAAAGCTG
1201–1248	ATCTCAGAAG	AAGATCTATC	CCATCATCAC	CATCATCATT	AACTCGAG

10.2 DNA-Sequenz von ConA-OspC

1–50	ATGGCAAGCA	CCCATGAAAC	CAATGCACTG	CATTTTATGT	TTAATCAGTT
51–100	TAGCAAAGAT	CAGAAAGATC	TGATTCTGCA	GGGTGATGCA	ACCACCGGCA
101–150	CCGATGGTAA	TCTGGAAGTC	ACCCGTGTTA	GCAGCAATGG	TAGTCCGCAG
151–200	GGTAGCAGCG	TTGGTCGTGC	ACTGTTTTAT	GCACCGGTTC	ATATTTGGGA
201–250	AAGCAGCGCA	GTTGTTGCAA	GCTTTGATGC	AACCTTTACC	TTTCTGATTA
251–300	AAAGTCCGGA	TAGCCATCCG	GCAGATGGTA	TTGCATTTTT	TATTAGCAAT
301–350	ATTGATAGCA	GCATTCCGAG	CGGTAGCACC	GGTCGTCTGC	TGGGTCTGTT
351–400	TCCGGATGCA	AATGTTATTC	GTAATAGCAC	CACCATTGAT	TTAATGCAG
401–450	CCTATAATGC	CGATACCATT	GTTGCAGTTG	AACTGGATAC	CTATCCGAAT
451–500	ACCGATATTG	GTGATCCGAA	TTATCCGCAT	ATTGGCATTG	ATATTAAG
501–550	CGTGCGCAGC	AAAAAAACCG	CCAAATGGAA	TATGCAGAAT	GGTAAAGTTG
551–600	GCACCGCACA	TATTATTTAT	AATAGCGTTG	GCAAACGTCT	GAGCGCAGTT
601–650	GTGAGCTATC	CGAATGGTGA	TAGCGCAACC	GTTAGCTATG	ATGTTGATCT
651–700	GGATAATGTT	CTGCCGGAAT	GGGTTCTGT	TGGTCTGAGC	GCAAGCACCG
701–750	GTCTGTATAA	AGAAACCAAT	ACCATTCTGA	GCTGGTCCTT	TACCAGCAAA
751–800	CTGAAAAGCA	ATGAAATTCC	GGATATTGCA	ACCGTTGTTG	GTGGTTCAGG
801–850	TGGTGGTTCA	GGTGGTGGTT	CAGGTATGAA	AAAGAATACA	TTAAGTGCGA

851–900	TATTAATGAC	TTTATTTTTA	TTTATATCTT	GTAATAATTC	AGGGAAAGGT
901–950	GGGGATTCTG	CATCTACTAA	TCCTGCTGAC	GAGTCTGCGA	AAGGGCCTAA
951–1000	TCTTACAGAA	ATAAGCAAAA	AAATTACAGA	TTCTAATGCA	TTTGTACTTG
1001–1050	CTGTTAAAGA	AGTTGAGACT	TTGGTTTTAT	CTATAGATGA	ACTTGCTAAG
1051–1100	AAAGCTATTG	GTCAAAAAAT	AGACAATAAT	AATGGTTTAG	CTGCTTTAAA
1101–1150	TAATCAGAAT	GGATCGTTGT	TAGCAGGAGC	CTATGCAATA	TCAACCCTAA
1151–1200	TAACAGAAAA	ATTGAGTAAA	TTGAAAAATT	TAGAAGAATT	AAAGACAGAA
1201–1250	ATTGCAAAGG	CTAAGAAATG	TTCCGAAGAA	TTTACTAATA	AACTAAAAAG
1251–1300	TGGTCATGCA	GATCTTGGCA	AACAGGATGC	TACCGATGAT	CATGCAAAAG
1301–1350	CAGCTATTTT	AAAAACACAT	GCAACTACCG	ATAAAGGTGC	TAAAGAATTT
1351–1400	AAAGATTTAT	TTGAATCAGT	AGAAGGTTTG	TTAAAAGCAG	CTCAAGTAGC
1401–1450	ACTAACTAAT	TCAGTTAAAG	AACTTACAAG	TCCTGTTGTA	GCAGAAAGTC
1451–1470	CAAAAAAACC	TTAACTCGAG			

10.3 DNA-Sequenz von ConA-C6

1–50	ATGGCAAGCA	CCCATGAAAC	CAATGCACTG	CATTTTATGT	TTAATCAGTT
51–100	TAGCAAAGAT	CAGAAAGATC	TGATTCTGCA	GGGTGATGCA	ACCACCGGCA
101–150	CCGATGGTAA	TCTGGAAGT	ACCGTGTTA	GCAGCAATGG	TAGTCCGCAG
151–200	GGTAGCAGCG	TTGGTCGTGC	ACTGTTTTAT	GCACCGGTTT	ATATTTGGGA
201–250	AAGCAGCGCA	GTTGTTGCAA	GCTTTGATGC	AACCTTTACC	TTTCTGATTA
251–300	AAAGTCCGGA	TAGCCATCCG	GCAGATGGTA	TTGCATTTTT	TATTAGCAAT
301–350	ATTGATAGCA	GCATTCCGAG	CGGTAGCACC	GGTCGTCTGC	TGGGTCTGTT
351–400	TCCGGATGCA	AATGTTATTC	GTAATAGCAC	CACCATTGAT	TTAATGCAG

401–450	CCTATAATGC	CGATACCATT	GTTGCAGTTG	AACTGGATAC	CTATCCGAAT
451–500	ACCGATATTG	GTGATCCGAA	TTATCCGCAT	ATTGGCATTG	ATATTAAAAG
501–550	CGTGCGCAGC	AAAAAAACCG	CCAAATGGAA	TATGCAGAAT	GGTAAAGTTG
551–600	GCACCGCACA	TATTATTTAT	AATAGCGTTG	GCAAACGTCT	GAGCGCAGTT
601–650	GTGAGCTATC	CGAATGGTGA	TAGCGCAACC	GTTAGCTATG	ATGTTGATCT
651–700	GGATAATGTT	CTGCCGGAAT	GGGTTCGTGT	TGGTCTGAGC	GCAAGCACCG
701–750	GTCTGTATAA	AGAAACCAAT	ACCATTCTGA	GCTGGTCCTT	TACCAGCAAA
751–800	CTGAAAAGCA	ATGAAATTCC	GGATATTGCA	ACCGTTGTTG	GTGGTTCAGG
801–850	TGGTGGTTCA	GGTGGTGGTT	CAGGTATGAA	GAAGGATGAT	CAGATTGCTG
851–900	CTGCTATGGT	TTTGAGGGGG	ATGGCTAAGG	ATGGACAGTT	TGCTTTGAAG
901–906	CTCGAG				

10.4 DNA-Sequenz von ConA-ProtA

1–50	ATGGCAAGCA	CCCATGAAAC	CAATGCACTG	CATTTTATGT	TTAATCAGTT
51–100	TAGCAAAGAT	CAGAAAGATC	TGATTCTGCA	GGGTGATGCA	ACCACCGGCA
101–150	CCGATGGTAA	TCTGGAAGTG	ACCCGTGTTA	GCAGCAATGG	TAGTCCGCAG
151–200	GGTAGCAGCG	TTGGTCGTGC	ACTGTTTTAT	GCACCGGTTC	ATATTTGGGA
201–250	AAGCAGCGCA	GTTGTTGCAA	GCTTTGATGC	AACCTTTACC	TTTCTGATTA
251–300	AAAGTCCGGA	TAGCCATCCG	GCAGATGGTA	TTGCATTTTT	TATTAGCAAT
301–350	ATTGATAGCA	GCATTCCGAG	CGGTAGCACC	GGTCGTCTGC	TGGGTCTGTT
351–400	TCCGGATGCA	AATGTTATTC	GTAATAGCAC	CACCATTGAT	TTAATGCAG
401–450	CCTATAATGC	CGATACCATT	GTTGCAGTTG	AACTGGATAC	CTATCCGAAT
451–500	ACCGATATTG	GTGATCCGAA	TTATCCGCAT	ATTGGCATTG	ATATTAAAAG

501–550	CGTGCGCAGC	AAAAAAACCG	CCAAATGGAA	TATGCAGAAT	GGTAAAGTTG
551–600	GCACCGCACA	TATTATTTAT	AATAGCGTTG	GCAAACGTCT	GAGCGCAGTT
601–650	GTGAGCTATC	CGAATGGTGA	TAGCGCAACC	GTTAGCTATG	ATGTTGATCT
651–700	GGATAATGTT	CTGCCGGAAT	GGGTTCGTGT	TGGTCTGAGC	GCAAGCACCG
701–750	GTCTGTATAA	AGAAACCAAT	ACCATTCTGA	GCTGGTCCTT	TACCAGCAAA
751–800	CTGAAAAGCA	ATGAAATTCC	GGATATTGCA	ACCGTTGTTG	GTGGTTCAGG
801–850	TGGTGGTTCA	GGTGGTGGTT	CAGGTAACAA	ATTCAACAAA	GAACAACAAA
851–900	ACGCGTTCTA	TGAGATCTTA	CATTTACCTA	ACTTAAACGA	AGAACAACGA
901–950	AACGCCTTCA	TCCAAAGTTT	AAAAGATGAC	CCAAGCCAAA	GCGCTAACCT
951–999	TTTAGCAGAA	GCTAAAAAGC	TAAATGATGC	TCAGGCGCCG	AAACTCGAG

10.5 Messwerte der ELISA Untersuchungen zu ConA-OspC und ConA-C6 mit Signifikanzermittlung

Tabelle 40: Messwerte aus Abbildung 53 Kapitel 5.6 n=6 für ConA-OspC

Bezeichnung	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6	Mittelwert	Stabw.
positiv mit Serum Hd3	1,408	1,436	1,397	1,434	1,42	1,421	1,41933333	0,01498888
positiv mit Serum CL-140	0,999	1,016	1,071	1,067	1,05	1,054	1,04283333	0,02896492
negativ mit SB-1983	0,095	0,083	0,092	0,086	0,083	0,091	0,08833333	0,00504645
negativ mit SB-1982	0,083	0,08	0,087	0,093	0,086	0,081	0,085	0,00477493
negativ mit SB-1976	0,086	0,085	0,091	0,083	0,084	0,079	0,08466667	0,00393277
negativ mit SB-1974	0,065	0,081	0,081	0,079	0,085	0,085	0,07933333	0,00742069
negativ (ohne FP, mit Serum)	0,026	0,025	0,028	0,019	0,024	0,028	0,02	0,00334664
negativ (ohne Serum, mit FP)	0,019	0,018	0,016	0,015	0,018	0,02	0,01766667	0,0018619

Tabelle 41: Messwerte aus Abbildung 55 Kapitel 5.6 n=6 für ConA-C6

Bezeichnung	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6	Mittelwert	Stabw.
positiv mit Serum Hd3	1,621	1,647	1,606	1,669	1,61	1,629	1,63033333	0,02394716
positiv mit Serum CL-140	1,325	1,313	1,344	1,35	1,337	1,35	1,3365	0,01486943
negativ mit SB-1983	0,093	0,096	0,098	0,097	0,091	0,093	0,09466667	0,00273252
negativ mit SB-1982	0,09	0,091	0,096	0,089	0,091	0,09	0,09116667	0,00248328
negativ mit SB-1976	0,086	0,083	0,08	0,087	0,086	0,084	0,08433333	0,00258199
negativ mit SB-1974	0,088	0,08	0,085	0,089	0,087	0,084	0,0855	0,00327109
negativ (ohne FP, mit Serum)	0,029	0,026	0,029	0,023	0,028	0,029	0,02733333	0,00242212
negativ (ohne Serum, mit FP)	0,026	0,019	0,022	0,021	0,024	0,022	0,02233333	0,00242212

10.6 Messwerte fTLI Nachweis auf 3D-Polymersinterkörpern

Tabelle 42: Messwerte aus Abbildung 77 Kapitel 5.8.8. n=3

Absorption bei 450 nm						
Bezeichnung	fTLI Konzentration in ng/ml	Messung1	Messung2	Messung3	Mittelwert	Stabw.
S14225	7,7	0,457	0,328	0,396	0,39366667	0,06453165
S38177	53,2	0,825	0,734	0,757	0,772	0,04731807
S39330	120	1,194	1,208	1,254	1,21866667	0,03139002

Tabelle 43: Messwerte aus Abbildung 78 Kapitel 5.8.8. n=3

Absorption bei 450 nm						
Bezeichnung	fTLI Konzentration in ng/ml	Messung1	Messung2	Messung3	Mittelwert	Stabw.
S14225	7,7	0,457	0,328	0,396	0,39366667	0,06453165
S41648	8,8	0,378	0,362	0,486	0,40866667	0,06744875
S37462	10	0,443	0,457	0,389	0,423	0,04808326
S39325	12,8	0,395	0,453	0,484	0,444	0,04517743
S42611	13,5	0,417	0,454	0,494	0,455	0,03850974
S37666	24,6	0,518	0,524	0,597	0,54633333	0,04398106
S38177	53,2	0,825	0,734	0,757	0,772	0,04731807

11 Publikationen

Dassinger N, Vornicescu D, Merkl S, Kehrel M, Dayyoub E, Bakowsky U and Keusgen M. A fusion protein for regenerative surfaces. *physica status solidi (a)* 05/2012; 209(5):832-838. DOI:10.1002/pssa.201100809 (1.21 Impact Factor)

Kehrel M, **Dassinger N**, Merkl S, Vornicescu D and Keusgen M. A novel approach for increasing sensitivity in lateral flow assays: Development of an enrichment module based on polyethylene sintered bodies. *physica status solidi (a)* 05/2012; 209(5):917-924. DOI:10.1002/pssa.201100789 (1.21 Impact Factor)

Merkl S, Vornicescu D, **Dassinger N**, Kehrel M, Harpel S and Keusgen M. Detection of whole cells using reflectometric interference spectroscopy. *physica status solidi (a)* 05/2012; 209(5):864-870. DOI:10.1002/pssa.201100818 (1.21 Impact Factor)

Dayyoub E, Belz E, **Dassinger N**, Keusgen M and Bakowsky U. A novel method for designing nanostructured polymer surfaces for reduced bacteria adhesion. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials* 06/2011; 208(6):1279 - 1283. DOI:10.1002/pssa.201001118 (1.62 Impact Factor)

Manuskripte in Bearbeitung:

Dassinger N, Vornicescu D, Merkl S, Dayyoub E, Bakowsky U and Keusgen M. A concanavalin A – streptavidin fusion protein as universal and reversible linker for bioassays

Dassinger N, Vornicescu D and Keusgen M. A new assay for detection of *feline* trypsin-like immunoreactivity in blood-serum.

Dassinger N, Vornicescu D and Keusgen M. Detection of borreliosis disease in blood serum using fusion proteins for sensitivity enhancement.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

„Diagnostische Fusions- und Linkerproteine zur Entwicklung neuartiger Immunoassays“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)